

**DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HORMONE
ANTIDIURETIQUE DANS LES URINES
CHEZ L'HOMME
APPLICATIONS**

**(Travail du laboratoire de Physiologie A
dirigé par le professeur J.F. CIER)**

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD — LYON I
et soutenue publiquement le 27 Octobre 1977
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Abdelkrim ZEBIDI

né le 25 Juin 1950
à Rejiche (TUNISIE)

**DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'HORMONE
ANTIDIURETIQUE DANS LES URINES
CHEZ L'HOMME
APPLICATIONS**
(Travail du laboratoire de Physiologie A
dirigé par le professeur J.F. CIER)

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD — LYON I
et soutenue publiquement le 27 Octobre 1977
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Abdelkrim ZEBIDI

né le 25 Juin 1950
à Rejiche (TUNISIE)



UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

Président de l'Université - Professeur GERMAIN D.

Premier Vice-Président - Professeur ELBAZ E.

Secrétaire Général - M. RAMBAUD J.

-:-:-:-:-

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE ET LEUR DIRECTEUR

ALEXIS CARREL - Professeur R. MORNEX

GRANGE-BLANCHE - Docteur SALLE B. (Maitre de Conférences Agrégé)

LYON-NORD - Docteur NEIDHARDT J.P. (Maitre de Conférences Agrégé)

SUD-OUEST - Professeur NORMAND J.

BIOLOGIE HUMAINE - Docteur REVILLARD (Maitre de Conférences Agrégé)

TECHNIQUES DE READAPTATION - Docteur MORGON A. (Maitre de Conférences Agrégé)

SCIENCES PHARMACEUTIQUES - Professeur BIZOLLON C.A.

SCIENCES ODONTOLOGIQUES - Docteur VINCENT R.

INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE - M. MILLON A.

MATHEMATIQUES - Professeur COMBET E.

PHYSIQUE - Professeur DELMAU J.

CHIMIE et BIOCHIMIE - Professeur HUET J.

SCIENCES DE LA NATURE - Professeur GINET R.

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES - Mle le Professeur WORBE Jeanne-Françoise

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE n° 1 - Professeur POUYET B.

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE n° 2 - Professeur GALLER - Directeur EN

OBSERVATOIRE - M. MONNET Guy - Astronome Adjoint

PHYSIQUE NUCLEAIRE - Professeur GUSAKOW M.

U.E.R. de MECANIQUE - Professeur COMTE-BELLIOT Geneviève

-:-:-:-:-



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554224_0009

RESPONSABLES D'ENSEIGNEMENT

de l'U.E.R. ALEXIS CARREL

-----■

1er Cycle -

Anatomie - M. Le Professeur BOUCHET Alain

Biologie - M. le Professeur GIROD Christian

Chimie-Biochimie - M. le Professeur COLOBERT Louis

M. le Docteur NOFRE Claude, Maitre de Conférences Agrégé

Histologie-Embryologie-Cytogénétique - M. le Professeur GIROD Christian

Mathématiques-Statistiques - M. Le Professeur SITE Jean

Physiologie - M. le Docteur PELLET Michel, Maitre de Conférences Agrégé

M. le Docteur SCHMITT Michel, Maitre de Conférences Agrégé

Physique-Biophysique - M. le Professeur BERGER Michel

Psychologie Médicale - M. le Professeur GUYOTAT Jean

Sciences Sociales et Economie Médicale - M. le Professeur ROCHE Louis

2ème Cycle -

Anatomie Pathologique - M. le Professeur TOMMASI Michel

M. le Docteur LOIRE Michel, Maitre de Conférences Agrégé

Bactériologie - M. le Professeur FLEURETTE Jean

Cardiologie - M. le Professeur FROMENT Roger

M. le Professeur GONIN André

Chirurgie Cardiaque - M. le Professeur MARET Gilbert

Chirurgie Digestive - M. le Professeur FRANCILLON Jacques

Chirurgie Générale - M. le Professeur LIARAS Henri

M. le Professeur DESCOTES Jacques

M. le Docteur SPAY Georges, Maitre de Conférences Agrégé

Chirurgie Infantile - M. le Docteur DAUDET Maurice, Maitre de Conférences Agrégé

Chirurgie osseuse-Orthopédique - M. le Professeur DE MOURGUES Georges

M. le Docteur COMTET Jacques, Maitre de
Conférences Agrégé

Dermatologie - M. le Docteur PERROT, Maitre de Conférences Agrégé

Endocrinologie - M. le Docteur BERTHEZENE François, Maitre de Conférences Agrégé

Gastro-Entérologie - M. le Professeur BEL André

Génétique Générale - M. le Docteur HERMIER Michel, Maitre de Conférences Agrégé

Gynécologie - M. le Professeur ROCHET Yves

M. le Docteur BREMOND Alain, Maitre de Conférences Agrégé

Hémobiologie - M. le Professeur MOREL Pierre

Hygiène - M. le Docteur MONIER Jean-Claude, Maitre de Conférences Agrégé

Maladies Infectieuses - M. GIROUD Maurice, Professeur Agrégé du Val de Grâce

Maladies du Sang - M. le Professeur REVOL Louis

Médecine Expérimentale - M. le Professeur MORNEX René

Médecine Légale - M. le Professeur ROCHE Louis

Médecine du Travail - M. le Professeur BOURRET Jacques

M. le Docteur EYSSETTE

Néphrologie - M. le Professeur FRANCOIS Bernard

Neuro-Chirurgie - M. le Professeur MANSUY Louis

M. le Docteur FISCHER Georges, Maitre de Conférences Agrégé

Neurologie - M. le Professeur DEVIC Michel

Obstétrique - M. le Professeur GARMIER René

Ophthalmologie - M. le Docteur PAUPERT RAVAUULT, Maitre de Conférences Agrégé

Oto-Rhino-Laryngologie - M. le Professeur MARTIN Henri

Parasitologie - M. le Docteur BATTESTI

Pédiatrie - M. le Professeur FRANCOIS René

Pharmacologie - M. le Docteur EVREUX, Maitre de Conférences Agrégé

Pneumo-Phtisiologie - M. le Professeur TOURAINE Roger

M. le Docteur BERNARD J.P., Maitre de Conférences Agrégé

Psychologie - M. le Professeur GUYOTAT Jean

M. le Docteur MARIE-CARDINE, Maitre de Conférences Agrégé

Radiologie - M. le Docteur BUFFARD, Maitre de Conférences Agrégé

M. le Docteur CHOLLAT Louis, Maitre de Conférences Agrégé

Rhumatologie - M. le Docteur MEUNIER, Maitre de Conférences Agrégé

Séméiologie Chirurgicale - M. le Docteur VIGNAL Jacques, Maitre de Conférences Agrégé

Séméiologie Médicale - M. le Professeur VIALA Jean-Jacques

Stomatologie - M. le Professeur DUMAS Pierre

Urgence-Réanimation - M. le Professeur DELEUZE Raymond

Mme le Docteur ESTANOVE Suzanne, Maitre de Conférence Agrégé

Urologie - M. le Docteur DUBERNARD P.

THESE de ABDELKRIM ZÉBIDI

COMPOSITION DU JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur J.F. CIER
Doyen Honoraire

ASSESSEURS : Monsieur le Professeur R. MORNEX
Directeur de l'U.E.R. Alexis Carrel

Monsieur le Professeur R. FLANDROIS

Monsieur le Professeur Agrégé C. GHARIB

Madame le Professeur Agrégé S. LYAGOUBI-OUAHCHI
Doyen de la Faculté de Médecine de Sousse - Tunisie

À TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A Monsieur M. BOUGHZALA

Consul Général de Tunisie à Lyon.

Nous le remercions vivement pour la générosité et l'accueil qu'il a toujours manifestés à l'égard de tous les Tunisiens.

Nous gardons un excellent souvenir de son dynamisme et de ses vastes qualités humaines.

A Monsieur MENETRIER

Directeur du CROUS de Lyon

et à son Personnel pour la sympathie et l'accueil manifestés à l'égard des Etudiants Etrangers.

À NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Doyen J.F. CIER

Directeur du Laboratoire de Physiologie
de l'UER Grange-Blanche

C'est grâce à son appui que nous avons pu venir en France.
Il nous a fait un grand honneur en nous accueillant dans
son Laboratoire où nous avons pu découvrir l'étendue de
ses connaissances, sa générosité et son humanisme.

Nous gardons un excellent souvenir de l'enseignement
qu'il nous a prodigué, de la patience et la bonté qu'il
a toujours manifestées à notre égard.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre plus vive
reconnaissance et notre profonde considération.

À NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. MORNEX

Directeur de l'U.E.R. Alexis Carrel

Nous sommes très honorés d'avoir parmi nos Juges, le Chercheur, le Clinicien et l'Enseignant dont nous avons pu apprécier les qualités.

Nous le remercions avec reconnaissance d'avoir bien voulu accepter de juger notre thèse.

Monsieur le Professeur R. FLANDROIS

C'est avec bienveillance qu'il nous a accueilli dans son Laboratoire où nous avons pu découvrir sa gentillesse, son dynamisme et sa rigueur scientifique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde considération.

Monsieur le Professeur Agrégé C. GHARIB

Je ne sais comment lui exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

Je lui dois toute ma carrière.

Madame le Professeur S. LYAGOUBI-OUAHCHI

Doyen de la Faculté de Médecine de Sousse (Tunisie)

Nous la remercions de s'être intéressée à notre carrière et nous avoir admis au sein de son Département de Physiologie, à la Faculté de Médecine de Sousse.

C'est un grand honneur pour nous qu'elle se soit intéressée à notre travail et ait accepté, malgré ses lourdes charges de siéger parmi nos Juges.

Nous lui exprimons nos remerciements pour la confiance qu'elle nous a toujours accordée.

À NOS MAITRES

Monsieur le Professeur H. BEN AYED
Doyen de la Faculté de Médecine de Tunis

Monsieur le Professeur Agrégé M. BEN NACEUR
Chef du Service de Cardiologie à l'Hôpital C. Nicolle à Tunis

Monsieur le Professeur H. GHARBI
Chef du Service de Radiologie à l'Hôpital d'Enfants à Tunis

Monsieur le Professeur B. HAMZA
Chef du Service de Pédiatrie et Directeur de l'Hôpital
d'Enfants à Tunis

Monsieur le Professeur Agrégé E. JEDDI
Directeur du Laboratoire de Physiologie à la Faculté de
Médecine de Tunis

Monsieur le Professeur Agrégé M. ZEGAYA
Directeur du Laboratoire de Physiologie à la Faculté de
Médecine de Tunis

A Monsieur le Professeur Agrégé J.J. LEGROS

(Laboratoire de Radioimmunologie de l'Université de Liège
Pr. FRANCHIMONT)

Nous tenons à lui exprimer tous nos remerciements pour les
dosages de neurophysines réalisés dans son laboratoire.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. SASSARD

Nous lui exprimons notre profonde admiration.

A Madame L. PEYRIN

Maitre de Recherches au C.N.R.S.

Son enseignement nous a été précieux.

A Anne-Marie ALLEVARD-BURGUBURU

Ghislaine GELEN

Brigitte SEMPORE-MARTIN

Catherine MEUNIER

leur travail, entrepris depuis de nombreuses années
a permis de mener à bien cette étude.

A Mademoiselle M. VINCENT

A nos Amis Guy ANNAT, Chelbi BELKAHIA et Daniel BENZONI

A tout le personnel du Laboratoire.

Nous remercions très vivement les Laboratoires SANDOZ de Paris et, en particulier, Messieurs J. CHOSSON et J.P. REBIERE qui nous ont fourni gracieusement la Lysine Vasopressine et l'Ocytocine dans cette étude.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

A.D.H.	hormone antidiurétique
A.V.P.	Arginine Vasopressine (hormone antidiurétique)
B/F	rapport entre la radioactivité liée aux anticorps et la radioactivité libre
B/B+F	rapport entre la radioactivité liée aux anticorps et la radioactivité totale présente dans le milieu d'incubation
°C	centigrade
C.D.I.	carbodiimide
c.p.m.	nombre de coups par minute
D.S.	écart type
E.D.T.A.	acide éthylène diamine tétraacétique
g	gramme
h	heure
^{125}I	substance marquée à ^{125}I
^{131}I	substance marquée à ^{131}I
Is	immunsérum
Kg	kilogramme
l	litre
L.V.P.	Lysine Vasopressine
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mOsm/kg	osmolalité exprimée en milliosmole/kilogramme
mU	milli unité
n	nombre
p	probabilité de dépassement
pg	picogramme
r	coefficient de corrélation
S/cm	Siemens/cm
TRIS	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
U	urinaire
UI	unité internationale
μCi	microcurie
μg	microgramme
μU	microunité

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PREMIERE PARTIE : Mise au point du dosage radioimmunologique de l'ADH dans les urines

Chapitre I : Principe du dosage Radioimmunologique	5
Chapitre II : Méthodes de marquage et propriétés de l'hormone marquée	10
Chapitre III: Obtention des anti-corps anti-LVP et leurs propriétés	18
Chapitre IV : Extraction de l'hormone antidiurétique urinaire	32
Chapitre V : Protocole de dosage radioimmunologique de l'AVP urinaire	37
Chapitre VI : Dosage biologique de l'hormone antidiurétique	49
Chapitre VII: Validité du dosage	54

DEUXIEME PARTIE : Applications

Chapitre I : Taux d'excrétion d'ADH urinaire par 24 heures.....	62
A - chez l'adulte	62
B - chez l'enfant	66
Chapitre II : Effets de la charge et de la restriction hydrique	69
Chapitre III : Corrélation entre osmolalité et excrétion d'ADH urinaire.....	74
Chapitre IV : Corrélation entre excrétion d'ADH et de neurophysines dans les urines	76

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	77
------------------------------------	----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	79
----------------------------	----

INTRODUCTION

La neurohypophyse, comprenant l'éminence médiane, la tige infundibulaire et la post-hypophyse, semble être une glande parfaitement connue avec ses deux peptides hormonaux : ocytocine et hormone antidiurétique (ou vasopressine).

En effet, on sait que ces deux hormones sont synthétisées, simultanément, avec deux molécules plus volumineuses : les Neurophysines. La neurophysine I, ou neurophysine stimulable par les œstrogènes, fixe électivement l'ocytocine, alors que la neurophysine II, ou neurophysine stimulable par la nicotine, fixe l'hormone antidiurétique (ADH) (LEGROS et coll., 1973; ROBINSON, 1975).

Le complexe neurophysine-hormone est transporté depuis le lieu de synthèse (noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus) par voie axonique jusqu'à la post-hypophyse où il est libéré par exocytose. C'est au moment de sa libération dans le plasma que le complexe se dissocie, expliquant la présence simultanée, dans le plasma, de neurophysines et d'hormones. La neurophysine n'est donc pas la molécule transporteuse plasmatique des peptides hypothalamiques. N'ayant, par ailleurs, aucune activité biologique propre, les neurophysines peuvent être considérées comme des témoins de la sécrétion d'ADH ou d'ocytocine. En effet, cette association neurophysine-hormone existe aussi en pathologie dans la plupart des cellules tumorales sécrétant de l'ADH, réalisant le syndrome de Schwartz-Bartter; pourtant une dissociation de sécrétion a été rapportée (ROBINSON, 1977).

L'exocytose du complexe ne se fait pas uniquement dans la circulation générale. On connaît deux autres voies de signification discutée : dans le système porte-hypophysaire et dans le III^{ème} ventricule. Dans ce dernier cas, l'hormone serait peut-être captée par des Tanycytes (cellules épendymaires à caractère sécrétoire) qui la rejetteraient dans le système porte (ZIMMERMAN et coll., 1976).

Si le point d'impact des hormones est parfaitement connu, deux points méritent pourtant attention :

. l'ADH agit sur le canal collecteur en favorisant la réabsorption de l'eau (par l'intermédiaire de l'AMPc) mais aussi en facilitant la réabsorption d'Urée qui participe à la constitution du gradient de concentration cortico-papillaire;

. c'est au niveau de la génération de l'AMPc qu'agissent quelques substances provoquant un diabète insipide néphrogénique, donc susceptibles d'être utilisées en thérapeutique dans les hypersécrétions d'ADH : c'est le cas des sels de lithium et des tétracyclines (ANDREOLI et coll., 1977).

Par contre, le mode d'action des médicaments substitutifs, utilisés dans le traitement des diabètes insipides, est plus complexe :

. diurétiques thiazidiques qui agissent par la déplétion sodée qu'ils provoquent,

. clofibrate et carbamazépine qui stimulent la sécrétion endogène (donc n'agissent pas dans le diabète néphrogénique),

. le chlorpropamide a une double action, augmentant la sécrétion et potentialisant l'effet de l'ADH sur le canal collecteur. Ce composé est inefficace s'il ne persiste pas une certaine sécrétion.

La régulation de ces 2 systèmes hormonaux fait appel à des mécanismes très différents : pour l'ocytocine, la sécrétion est réglée par un feedback positif déclenché à partir des 2 organes effecteurs utérus et glande mammaire. Pour l'ADH, elle fait intervenir, outre l'osmolarité et la volémie, l'Angiotensine II (A II) qui est un stimulus important de la sécrétion d'ADH, de même qu'elle est un stimulant de la soif (EPSTEIN et coll., 1973). Sécrétion d'ADH et soif ont donc trois mécanismes de mise en jeu communs. Mais la barrière hémocéphalique empêche le passage de l'A II. Ce passage pourrait se faire au niveau de l'organe sous-fornical.

Mais l'ADH et l'ocytocine ont certainement d'autres actions. C'est ainsi que l'ADH interviendrait dans les processus de mémorisation, que l'acide pressinoïque (qui est le fragment cyclique de l'ADH) aurait une action C.R.F. très importante (De WIED, 1976). On peut également se demander quel est le rôle de l'ocytocine chez le mâle ? On a pu montrer que l'extrémité C terminale de l'ocytocine (donc un tripeptide comme la TRH) pouvait modifier le comportement. D'où la tentation (actuellement non justifiée) de faire de ces 2 peptides des pro-hormones.

Enfin, notons que l'on a mis en évidence dans la glande pinéale de l'Homme, des neurophysines et de la Vasotocine, molécule ancestrale que l'on trouve chez les Reptiles et les Poissons (RICHARD-RELKIN, 1976).

Face à cette somme de connaissances, il paraît paradoxal que le dosage de ces hormones pose encore des problèmes, surtout en clinique. Nous ne parlerons pas du dosage de l'ocytocine qui n'a, actuellement, aucun intérêt en routine. En ce qui concerne l'ADH on peut la doser par radioimmunologie dans le plasma, mais, comme pour l'ocytocine, il existe une sécrétion épisodique obligeant à des dosages multiples et rapprochés (GEORGE et coll., 1975; RUBIN et coll., 1975). La complexité du dosage est telle qu'actuellement aucun laboratoire européen ne peut proposer le dosage en ROUTINE. Le dosage biologique plasmatique a été conservé dans plusieurs laboratoires, mais il n'a d'intérêt que si le taux suspecté est élevé, c'est-à-dire lors des sécrétions inappropriées d'ADH. Mais souvent le diagnostic n'a pas besoin, dans ces conditions, de cet argument. En particulier, une clearance de l'eau libre correctement pratiquée apporte souvent la preuve définitive de ce trouble.

L'ADH urinaire, par contre, est plus facilement dosée et donne des résultats très intéressants pour le clinicien. C'est l'objet de notre travail.

Il est également possible de doser, dans le plasma et dans les urines, les neurophysines. Dans la plupart des cas, le dosage proposé mesure globalement le taux de neurophysines I et II, ce qui explique en clinique, souvent, la discordance entre ADH plasmatique et neurophysines. C'est, en particulier, ce qui se passe lors de certains diabètes insipides centraux (LEGROS, 1973; ROBINSON et coll., 1975).

Il est donc difficile, d'après le dosage global de neurophysines, de savoir l'état de la sécrétion post-hypophysaire.

Grâce à la collaboration du Laboratoire du Professeur J.J. LEGROS (Liège), nous avons dosé parallèlement l'ADH et les neurophysines urinaires chez des sujets normaux dans le but d'établir une éventuelle corrélation entre les deux.

PREMIÈRE PARTIE

MISE AU POINT DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE D'ADH
DANS LES URINES

CHAPITRE I

PRINCIPE DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

Le dosage radioimmunologique (RID) a été initialement décrit en 1959 par BERSON et YALOW à propos de l'insuline. Dès 1956, ces auteurs avaient remarqué que des malades diabétiques traités par de l'insuline de porc présentaient des anticorps anti-insuline dans le plasma. Ils ont montré, par la suite, que lorsque de l'insuline marquée à l'Iode 131 (^{131}I) est ajoutée à du sérum provenant de ces malades, il se forme un complexe radioactif avec les gamma-globulines; l'addition d'insuline non marquée fait baisser l'activité de ce complexe.

Cette observation fut à l'origine d'une technique de dosage de l'insuline qui a pris, depuis, une extension considérable.

Le principe du RID sera rappelé en prenant pour exemple les hormones protéiques ou polypeptidiques.

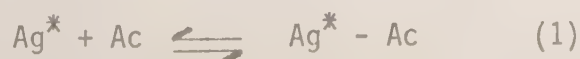
L'antigénicité d'une hormone ou d'un antigène (Ag) suscite la formation d'anticorps anti-hormone (Ac). L'interaction de l'hormone et de l'anticorps conduit à la formation d'un complexe Ag-Ac; aux faibles concentrations d'Ag et d'Ac utilisées en radioimmunologie, le complexe Ag-Ac est soluble.

De plus, par principe, l'Ac est utilisé en concentration juste suffisante pour lier toute l'hormone présente dans le milieu.

Le principe du dosage repose sur la compétition entre l'Ag marqué par un isotope (Ag^*) et le même Ag non marqué ou froid (Ag) vis à vis de leur anticorps spécifique; à la spécificité rigoureuse de la réaction vient alors s'ajouter la haute sensibilité de détection de la radioactivité.

L'application de ce principe nécessite trois opérations :
(fig. 1)

1/ marquer l'antigène au moyen d'un isotope pour quantifier la réaction Ag Ac :



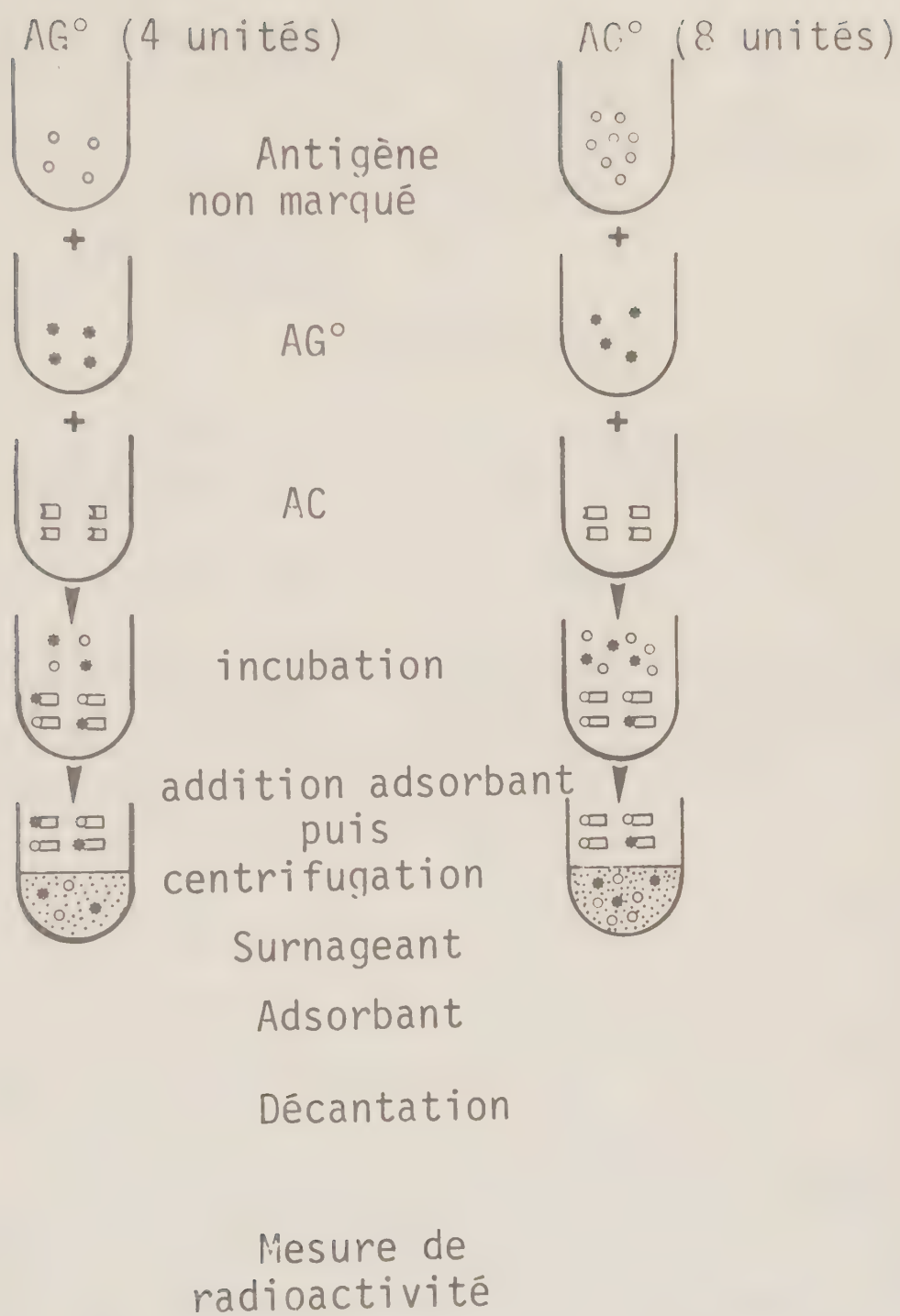


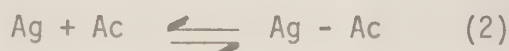
Fig. 1 - Application pratique du principe radioimmunologique

Cette réaction réversible aboutit à un équilibre entre les formes : libre (Ag^*) et liée ($\text{Ag}^* - \text{Ac}$) de l' Ag^* ; l' Ag^* libre est couramment appelé F ou "free", l' Ag^* lié est appelé B ou "bound". Cet équilibre peut s'écrire ainsi d'après la loi d'action de masse :

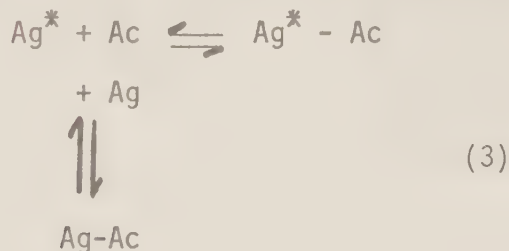
$$\frac{(\text{Ag}^* - \text{Ac})}{(\text{Ag}^* - \text{Ac}) + (\text{Ag}^*)} = \frac{\text{B}}{\text{B} + \text{F}}$$

$$\text{B} + \text{F} = \text{T} : \text{radioactivité totale}$$

2/ Introduire dans le système l' Ag non marqué (Ag) qui va entrer en compétition avec l' Ag^* et réagir avec l' Ac selon la réaction suivante :



Ainsi, lorsqu'une quantité variable de l' Ag froid se trouve dans le milieu réactionnel $\text{Ag}^* - \text{Ac}$, il se produit une compétition parfaite entre les deux formes de l' Ag telle que la définissent les équilibres suivants :



Les quantités d' Ag^* et d' Ac sont, par principe, constantes; toute adjonction d' Ag froid entraîne une diminution de l' Ag^* fixé à l' Ac et une augmentation de l' Ag^* libre dans le milieu réactionnel. Ainsi, la proportion d' Ag^* libre et celle d' Ag^* lié à l' Ac sont directement fonction de la quantité d' Ag non marqué présente dans le milieu.

En mesurant la radioactivité, on pourra très précisément mesurer Ag^* et $\text{Ag}^* - \text{Ac}$ soit F et B. Mais du fait que dans le tube réactionnel co-existent les radioactivités F et B, il est donc nécessaire de les séparer.

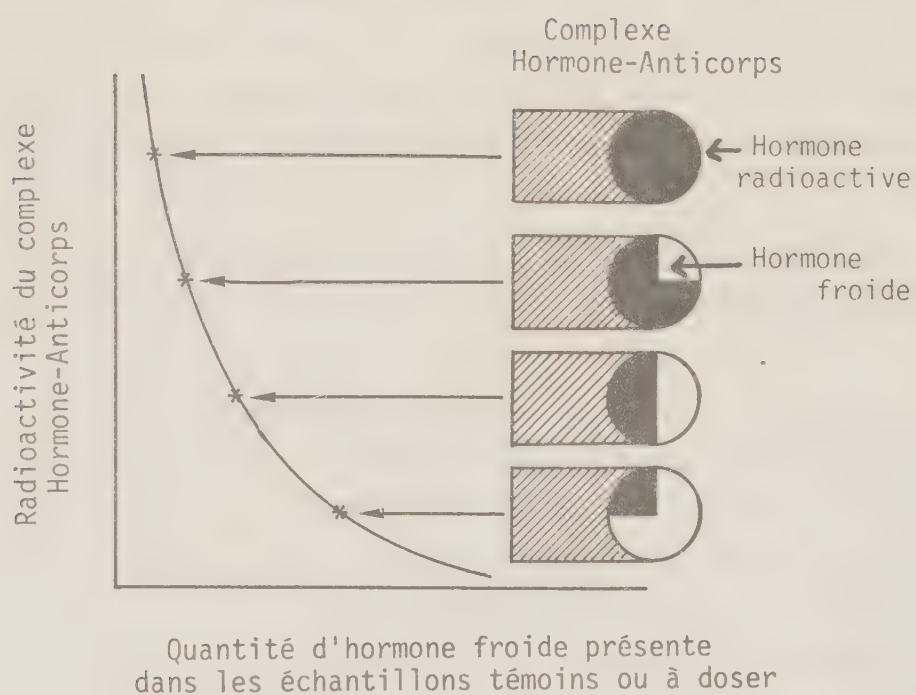


Fig. 2 - Principe du R.I.D. d'une hormone par la méthode de BERSON et YALOW
 (d'après BERSON, S.A. et YALOW, R.S. in CIER J.F. *Encyclopédie Méd. Chir.*)

3/ Se comportant comme antigène, il suffit de comparer l'effet d'inhibition ou de compétition que détermine cette substance sur l'équilibre Ag^*-Ac par rapport aux effets de quantités connues de la même substance ou Ag froid.

On voit sur la figure 2 que des quantités croissantes d'Ag froid produisent une décroissance de la radioactivité liée à l'Ac ou B alors que F croît de façon proportionnelle.

Pour un échantillon inconnu, il suffit donc (après que le milieu réactionnel ait atteint l'équilibre) de mesurer B et F ; en reportant la valeur obtenue sur la courbe standard établie dans les mêmes conditions expérimentales on déduit sur l'abscisse la concentration de la substance antigénique étudiée dans le milieu biologique.

Les modes d'expression les plus couramment utilisés pour représenter la fraction de substance radioactive liée aux anticorps sont les suivants :

- . B/F : antigène marqué lié aux anticorps/antigène marqué libre
- . $B/T \times 100$: antigène marqué lié aux anticorps/antigène marqué total présent dans le milieu d'incubation $\times 100$
- . $B_x/B_0 \times 100$: ce mode d'expression donne le pourcentage de substance marquée liée aux anticorps en présence d'une quantité x de substance non marquée (B_x) exprimée par rapport à la quantité de substance marquée liée aux anticorps en l'absence de toute substance froide (B_0).

. enfin la transformation en logit, plus rarement utilisée, aboutit à la représentation graphique de la courbe de référence sous forme d'une droite.

Cette méthode est actuellement appliquée au dosage de très nombreuses hormones polypeptidiques. C'est en 1965 qu'ont été publiés par GILLILAND et PROUT (1965) par ROTH et col.; PERMUTT et col. (1966) les premiers essais de dosage de l'hormone antidiurétique (ADH).

Un tel procédé de dosage ne peut être exploité que si l'on dispose d'une hormone marquée de haute activité spécifique et ayant les mêmes caractères que l'hormone froide et d'un immun-sérum très spécifique.

CHAPITRE II

MÉTHODES DE MARQUAGE ET PROPRIÉTÉS DE L'HORMONE MARQUÉE

La détection de quelques pg d'hormone dans un milieu biologique n'est possible que si l'on dispose d'une hormone marquée de haute activité spécifique.

A - PROCÉDES DU MARQUAGE -

1/ Choix du Traceur -

Pour les hormones polypeptidiques et pour le radioimmunos dosage, le ^{14}C ou ^3H ne peuvent être utilisés car l'activité spécifique théorique atteinte est trop basse.

L'iode est le plus couramment utilisé; on dispose de deux isotopes : ^{131}I et ^{125}I . Malgré la plus grande activité spécifique de l'isotope ^{131}I , 125 mC/ μg contre 18 mC/ μg , pour 100% d'abondance isotopique dans les deux cas, on préfère utiliser l' ^{125}I (HUNTER, 1962). En effet, les produits formés à partir de l' ^{125}I ont une période de deux mois alors que ceux formés à partir de ^{131}I ont une période de huit jours. D'autre part, le choix de l'isotope dépend du nombre de tyrosines au sein de la molécule à ioder; s'il y a une ou deux molécules de tyrosine il vaut mieux utiliser l' ^{125}I qui a une abondance isotopique plus importante (95% contre 20 à 25% pour l' ^{131}I).

Pour la lysine vasopressine (LVP) c'est le mode de marquage le plus courant : un ou, au maximum, deux atomes d'iode peuvent être fixés sur les groupements phényl de la tyrosine.

2/ Protocoles de l'iodation de la LVP -

Nous avons préféré utiliser la lysine vasopressine (LVP), hormone naturelle du Porc (FERGUSSON et HELLER, 1965) à l'arginine vasopressine (AVP) bien que c'est cette dernière qui sera dosée effectivement. En effet, l'AVP est d'obtention plus difficile et de conservation délicate car elle dimérise facilement.

La plupart des auteurs utilisent la technique de GREENWOOD, HUNTER et GLOVER (1963) : l'iodure de sodium $\text{Na } ^{125}\text{I}$ est oxydé par la chloramine T avec formation d'un iode cationique I^+ ou iodinium; la réaction suivante consiste en une substitution de I^+ sur le groupement phényl de la tyrosine de la molécule de LVP. La réaction d'iodation réalisée, on ajoute du métabisulfite de sodium en excès de façon à réduire la chloramine T et les radicaux iodés oxydés et instables en iodures.

GLICK et coll. (1969) ont proposé de supprimer l'utilisation du métabisulfite; en effet, son pouvoir réducteur très puissant paraît altérer le comportement physico-chimique des hormones post-hypothalamo-hypophysaires avec, en particulier, possibilité de réduction du pont disulfure de la cystéine (FRANCHIMONT, 1971).

Nous avons employé la technique de ROTH et coll. (1966) qui utilise le Dowex pour arrêter l'oxydation à la place du métabisulfite de sodium.

Dans un tube réactionnel, avant le marquage, sont ajoutés successivement :

- 7 μl de $\text{Na } ^{125}\text{I}$ fourni par Amersham (environ 700 μC) après centrifugation préalable,
- 20 μl de tampon phosphate fort 0,5 M à pH 7,4
- 15 μl de LVP (ampoule à 100 UI/ml) soit environ 5,55 μg^*
- 20 μl de la solution de chloramine T à 3,5 mg/ml

Cette solution est préparée juste avant le marquage : 7 mg de chloramine T dans 2 ml de tampon phosphate faible 0,15 M à pH 7,4.

On agite doucement pendant 15 à 20 secondes puis le contenu du tube réactionnel est rapidement transféré sur du Dowex 1 x 10 (100-200 mesh sous forme Cl^-). Le Dowex est préparé avant le marquage en ajoutant 1 ml d'eau distillée à 150 mg de Dowex.

On agite énergiquement et l'on centrifuge pendant 1 minute à 2000 tours/minute. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur et transféré sur la colonne de purification.

Il est important d'effectuer les marquages dans les mêmes conditions, surtout en respectant toujours le même temps de contact avec la chloramine T.

* voir plus loin l'équivalence entre UI et ng.

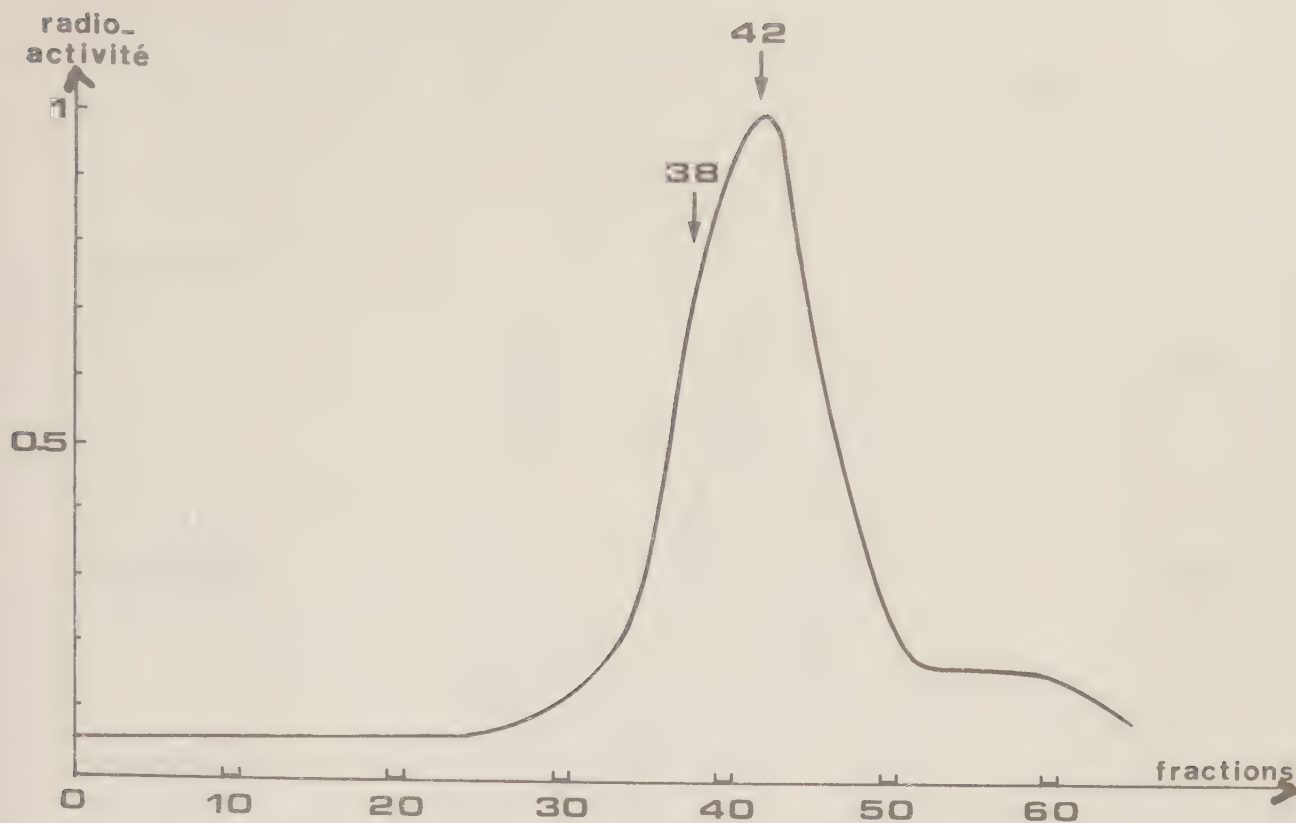


Fig. 3 - Chromatographie sur colonne de Séphadex G25 de ^{125}I -LVP
Après iodation de la LVP, le surnageant est immédiatement transféré sur la colonne (hauteur : 30 cm; diamètre : 1 cm).
L'hormone marquée est éluée avec du tampon acide acétique 0,02 M à pH 4,5

* cpm
* LVP mU

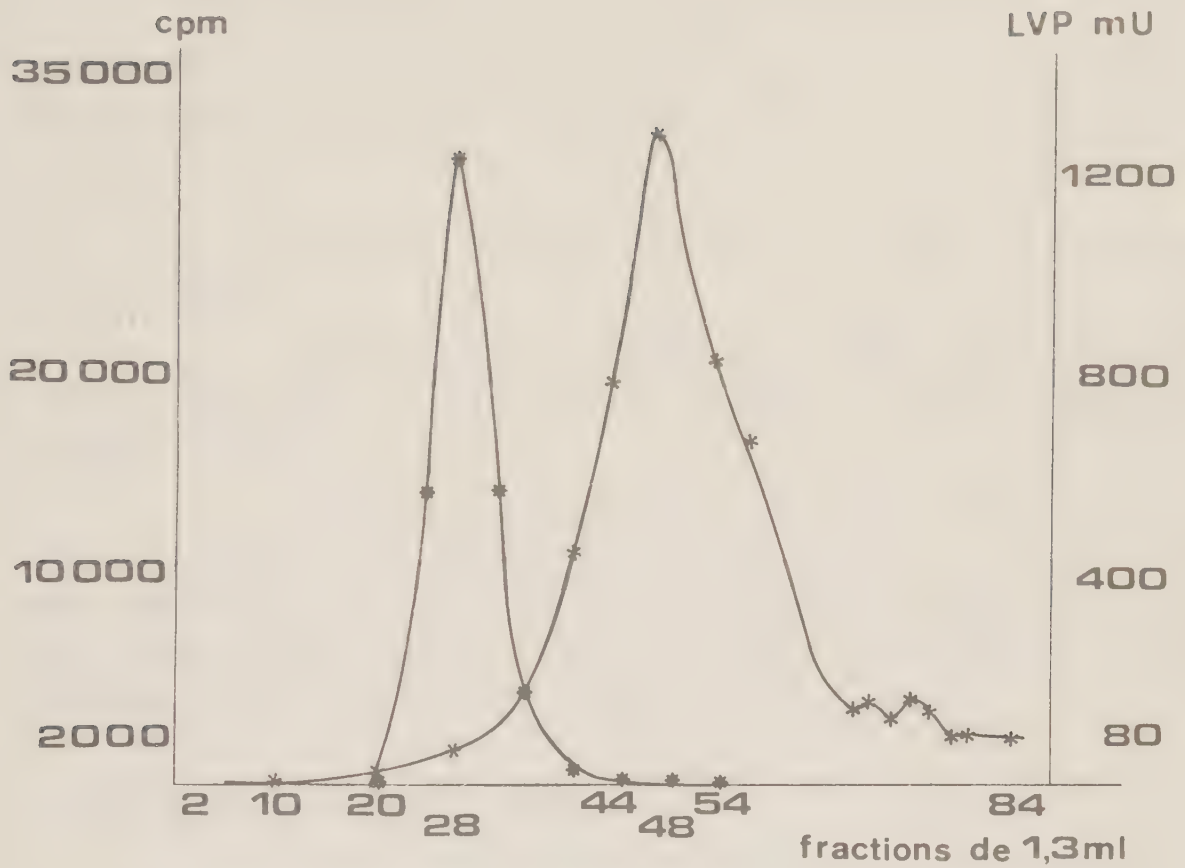


Fig. 4 - Comparaison de la filtration sur gel de Séphadex G25 de la LVP marquée (^{125}I -LVP) et de la LVP de synthèse (LVP) (MARCHETTI, 1975)
Le sommet du pic d'élution de la LVP iodée apparaît au 48ème tube, alors qu'il n'apparaît qu'au 28ème tube pour la LVP de synthèse.

3/ Purification de la LVP iodée par filtration sur gel de Séphadex -

Nous avons utilisé la technique mise au point par KLEIN & coll. (1966) qui consiste en une chromatographie d'exclusion sur Séphadex G₂₅ Fine mise en colonne (1 x 30 cm) et équilibrée par du tampon acide acétique 0,02 M à pH 4,5.

L'éluat est collecté par fraction de 0,7 ml (le débit étant de 0,7 ml/minute).

L'¹²⁵I-LVP est plus efficacement retenue sur la colonne que la LVP non iodée; le pic de radioactivité n'apparaît que vers la 40^{ème}-44^{ème} fraction (fig. 3).

La filtration sur gel de Séphadex permet donc de séparer la LVP non iodée de la LVP iodée; il est possible d'obtenir un lot de LVP marquée sans contamination notable par la LVP non marquée : seulement 2,5% de la LVP non marquée ont été retrouvés dans les fractions qui correspondent au maximum du pic de la ¹²⁵I LVP (MARCHETTI, 1975) (fig. 4).

B - PROPRIETES DE L'HORMONE MARQUEE -

La détermination de l'activité spécifique nous a permis d'étudier le comportement immunologique et biologique de la ¹²⁵I-LVP.

1/ Activité immunologique -

Le comportement de la vasopressine marquée vis à vis des anticorps a été étudié dans le système radioimmunologique. Lorsque des quantités croissantes d'hormone marquée, purifiée sur gel de Séphadex G₂₅ Fine, sont ajoutées au milieu réactionnel, la fraction d'hormone liée diminue bien que la quantité totale de ¹²⁵I-LVP augmente. Les points expérimentaux obtenus tombent à intervalles réguliers sur la courbe standard établie à l'aide du peptide de synthèse, en fonction des quantités de LVP marquée ajoutées. Ceci indique que les anticorps anti-LVP ne distinguent pas la LVP marquée de la LVP de synthèse.

La figure 5 montre que 100 µl d'une solution de ¹²⁵I LVP diluée au 1/500[°] renfermant 4700 cpm produisent, en moyenne, la même diminution du pourcentage de B/B+F que celle observée si l'on ajoute 2,2 pg de LVP de synthèse. Dans ces conditions, l'activité spécifique est d'environ 1500 µC/µg, ce qui correspond environ à un degré d'iodation de 0,75 et laisse supposer que l'on a à faire à une hormone marquée mono-iodée.

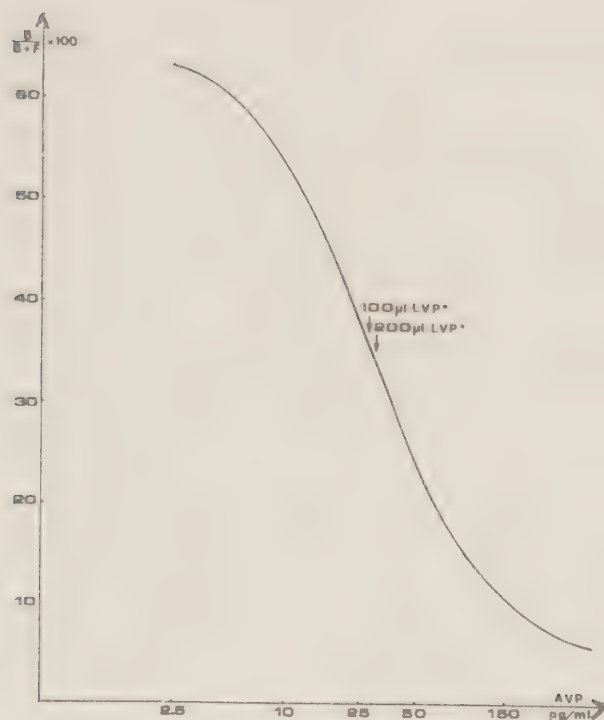


Fig. 5 - Dosage de la LVP marquée à l'Iode 125 .

Chaque incrément de LVP marquée, ajouté au mélange réactif produit une diminution du rapport B/F.

La figure indique que 100 µl de ^{125}I -LVP diluée au 1/500^e produisent une diminution du rapport B/F équivalente à celle que donne l'addition de 2,2 pg de vasopressine de synthèse; alors que 200 µl de la même solution de ^{125}I -LVP produisent une diminution du rapport B/F équivalente à l'addition de 4,5 pg de vasopressine de synthèse.

2/ Activité biologique de la vasopressin Iodée -

L'activité biologique de la ^{125}I LVP a été testée après l'étape de purification sur gel de Séphadex G25. Elle est très faible et très variable d'un marquage à l'autre par rapport à l'activité antidiurétique théorique.

Ces derniers résultats suggèrent que l'introduction d'un atome d'iode dans la molécule fait perdre à la LVP son pouvoir antidiurétique. La présence dans le pic d'un faible pourcentage de LVP non marquée pourrait être responsable d'une partie de la réponse antidiurétique observée.

Une perte ou une diminution de l'activité biologique de certaines hormones polypeptidiques, due à la présence d'atome d'iode dans la molécule, ont été signalées par plusieurs auteurs :

- La LVP marquée obtenue par MENARD et coll. (1973), après purification par chromatographie d'affinité sur la neurophysine de Porc couplée à du Sépharose 4 B, possède moins de 1% de l'activité biologique de l'hormone non marquée, mesurée en évaluant la stimulation de l'adénylcyclase de la médulla de rein de Porc.

- L'iodation progressive de l'ocytocine par le monochlorure d'iode diminue progressivement l'activité biologique de l'hormone; cette activité a été mesurée en évaluant l'élévation de la pression artérielle chez la Poule (BOCKAERT, 1973).

- L'ocytocine monoiodée perd de 10 à 40% de son activité adényl cyclasique sur des homogénats d'épithélium de vessie de crapaud (THOMPSON et coll., 1972).

- Les réponses de l'angiotensine au niveau de l'utérus, du colon et sur la pression artérielle de Rat diminuent en fonction du nombre d'atomes d'iode introduits dans la molécule marquée : l'angiotensine monoiodée possède un pouvoir biologique de 25 à 80% de celui de l'hormone native; celui de l'angiotensine diiodée n'est plus que de 2 à 4% (LIN, 1970).

DISCUSSION -

Le marquage s'est avéré très délicat au début de la mise au point du dosage. Nous avons pu obtenir une hormone marquée après 2 purifications successives; cependant, l'activité spécifique du produit marqué était très faible. En effet, la LVP est très altérée lors de l'arrêt de l'oxydation par le métabisulfite de sodium; il se produit probablement une réduction du pont disulfure de la cystéine avec formation de dimères et de polymères qui inter-

fèrent dans le dosage radioimmunologique (FRANCHIMONT, 1971).

Nous avons alors renoncé au marquage de la LVP et nous avons utilisé la ^{125}I LVP fournie par le C.N.T.S. de Paris. L'activité spécifique de cette hormone était variable et se situait au voisinage de 1300 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ de LVP.

Depuis que nous utilisons le Dowex à la place du métabisulfite de sodium pour arrêter l'oxydation, nous avons toujours eu une hormone marquée d'activité spécifique satisfaisante (1500 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ de LVP).

Il faut mentionner l'importance de la température de conservation sur la stabilité de l'hormone marquée. L'hormone est congelée à -20°C dans les 2 heures qui suivent le marquage diluée au $1/25^{\circ}$ et en présence de lysosyme. Elle est alors stable pendant au moins 3 semaines. Elle ne peut être gardée à 4°C que pendant quelques heures et elle n'est pas réutilisable après sa décongélation.

CHAPITRE III

OBTENTION DES ANTICORPS ANTI-LVP ET LEURS PROPRIÉTÉS

A - OBTENTION DES IMMUNISERUMS ANTI-LVP -

1/ Couplage de la LVP à la sérum-albumine -

Le pouvoir antigénique d'une substance dépend à la fois de son poids moléculaire et de sa composition chimique. La plupart des hormones polypeptidiques de poids moléculaire élevé (supérieur à 10.000) ont une puissante immunogénicité. D'autres composés, tels que les stéroïdes et les polypeptides de poids moléculaire inférieur à 3.000 développent plus difficilement une réponse immunitaire chez l'animal.

Cependant, ce pouvoir antigénique peut être augmenté lorsque l'on couple ces polypeptides de façon covalente à des protéines de grandes dimensions. Des procédés chimiques assez variés peuvent être employés pour lier de telles substances considérées comme haptènes à une molécule de protéine (NISONOFF et coll., 1967).

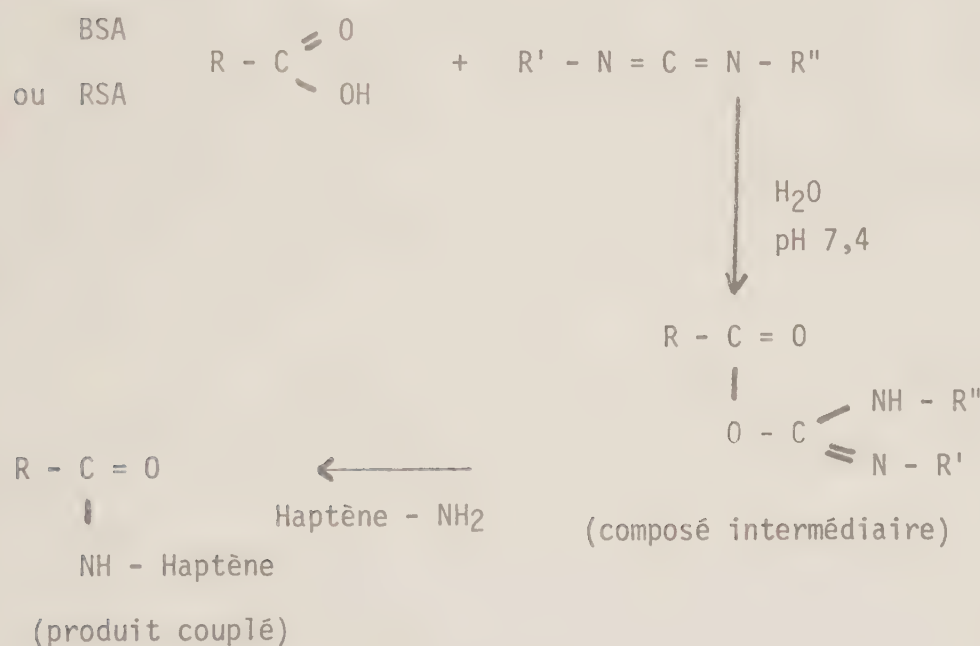
Divers travaux concernant la spécificité des anticorps, obtenus en utilisant comme antigène un complexe haptène-protéine, ont montré que la spécificité antigénique est principalement dirigée vers la partie de la molécule la plus éloignée du point d'attache à la protéine (PERMUTT & coll., 1966). Ainsi, l'injection à des animaux de ces substances conjuguées permet d'obtenir des anticorps spécifiques de l'haptène. Les animaux immunisés peuvent, par ailleurs, développer des anticorps contre la protéine utilisée pour le couplage. C'est pour cela qu'il est préférable d'employer une protéine homologue telle que la sérum-albumine de Lapin quand il s'agit d'immuniser des lapins.

Nous avons utilisé, pour les immunisations, la LVP fournie par SANDOZ, plus stable que l'AVP et plus facile à se procurer, bien que l'AVP soit à doser effectivement. La LVP est couplée à la sérum-albumine de Boeuf (BSA) ou à la sérum-albumine de Lapin (RSA) selon la technique de GOODFRIEND, LEVINE et FASMAN (1964), appliquée à la LVP par PERMUTT et collaborateurs (1966) et MILLER et MOSES (1969).

Le couplage implique une liaison de type $\begin{array}{c} \text{-C-NH-} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$

entre les deux composés. L'établissement de cette liaison ne peut être directement réalisé ; il est nécessaire d'employer un agent activant tel que la carbodiimide : 1-éthyl,3(3 diméthyl-aminopropyl)carbodiimide ou le glutaraldéhyde.

La réaction de conjugaison avec la carbodiimide s'effectue en 2 étapes : d'abord formation d'un composé intermédiaire protéine-carbodiimide avec activation du groupement carboxyle, ensuite formation du complexe haptène-protéine, par l'intermédiaire d'une liaison amide.



Couplage LVP, BSA, Carbodiimide :

5 mg de BSA cristallisée sont dissous dans 3 ml d'une solution de LVP contenant 300 UI (1,2 mg environ) ajustée à pH 7,4. On ajoute à l'ensemble 50 mg de carbodiimide; le mélange est agité puis laissé pendant 30 minutes à la température ambiante.

Couplage LVP, BSA, glutaraldéhyde :

2 mg de BSA cristallisée sont dissous dans 3 ml d'une solution de LVP contenant 300 UI et ajustée à pH 7,4. On ajoute 12,5 mg de glutaraldéhyde; le mélange est agité puis laissé pendant 2 heures à température ambiante.

Dans tous les cas, les mélanges sont dialysés contre 3 litres d'eau distillée pendant 24 heures à 4°C.

Ni la mesure de l'effet pressif ni celle de l'effet antidiurétique du dialysat ne permettent de mettre en évidence de la LVP ou de l'AVP (MARCHETTI, 1975). Le rendement de la réaction de conjugaison est supérieure à 70% quand le rapport molaire LVP / BSA est de l'ordre de 10.

Nous avons utilisé, dans un premier temps, l'adsorption de la LVP sur du charbon de bois suivant la technique décrite par BOYD (1967) pour l'obtention des immunosérums. Le charbon présente l'avantage d'être immunologiquement inerte, donc d'induire la formation d'anticorps de spécificité plus étroite, mais, malheureusement, les résultats sont très inconstants.

2/ Procédés d'immunisation -

Pour favoriser la formation d'anticorps, le complexe LVP-BSA est injecté après émulsion à volume égal en présence d'adjuvant complet de Freund. L'adjuvant minimise les effets physiologiques de l'hormone et évite la dégradation rapide de l'immunogène par les enzymes protéolytiques. Ce mélange présente, en plus, des pouvoirs antigéniques plus puissants. Il favorise la phagocytose de l'antigène par les macrophages, provoque la formation de lésions granulomateuses qui sont des foyers de formation d'anticorps et, enfin, stimule la prolifération des cellules lymphoïdes immunologiquement compétentes.

Le Lapin a été choisi, comme animal à immuniser, en raison de la grande quantité de sérum dont il est susceptible de fournir, de la possibilité et de la facilité d'effectuer de nombreux prélèvements et de sa grande résistance.

Au cours de la première immunisation, 0,5 ml du complexe contenant environ 100 UI de LVP sont émulsionnés avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund. On réalise des injections multiples par voie sous-cutanée, intradermique et intramusculaire. L'immunisation est entretenue par l'administration, à intervalles réguliers de 2 semaines, de 100 à 150 UI de LVP, pour les 4 premières immunisations; puis tous les mois en utilisant la même quantité d'antigène.

Les prélèvements sanguins permettent de suivre l'évolution de la formation d'anticorps à partir de la 4ème immunisation, au 7ème jour qui suit la dernière immunisation.

B - PROPRIETES DES ANTICORPS ANTI-LVP -

Les aspects théoriques du problème de la sélection des immun-sérums sont basés sur le principe d'une réaction bimoléculaire réversible d'ordre "un" régie par la loi d'action de masse



k = constante d'association
 k' = constante de dissociation

La constante d'équilibre est $K = \frac{k}{k'} = \frac{[\text{Ag} - \text{Ac}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ac}]}$

Les immun-sérums ne sont pas homogènes. Ils contiennent des mélange d'anticorps qui présentent différents sites de liaison avec différentes constantes d'affinité.

Le comportement, vis à vis d'un antigène donné, de différents immun-sérums provenant d'animaux immunisés de façon identique, peut varier dans de grandes proportions. Il faut donc sélectionner les sérums présentant les qualités suivantes :

- ils doivent présenter une concentration suffisante en anticorps afin d'être utilisés à une dilution telle que le milieu protéique n'interfère pas,
- ils doivent être sensibles
- ils doivent être spécifiques

Toutefois, dans le cas du dosage radioimmunologique de l'ADH; il faut rappeler que l'immunisation des lapins est réalisée en utilisant la LVP comme antigène et que, en conséquence, une spécificité absolue de nos immun-sérums aboutirait à une impossibilité du dosage puisque l'hormone physiologique à doser est l'AVP.

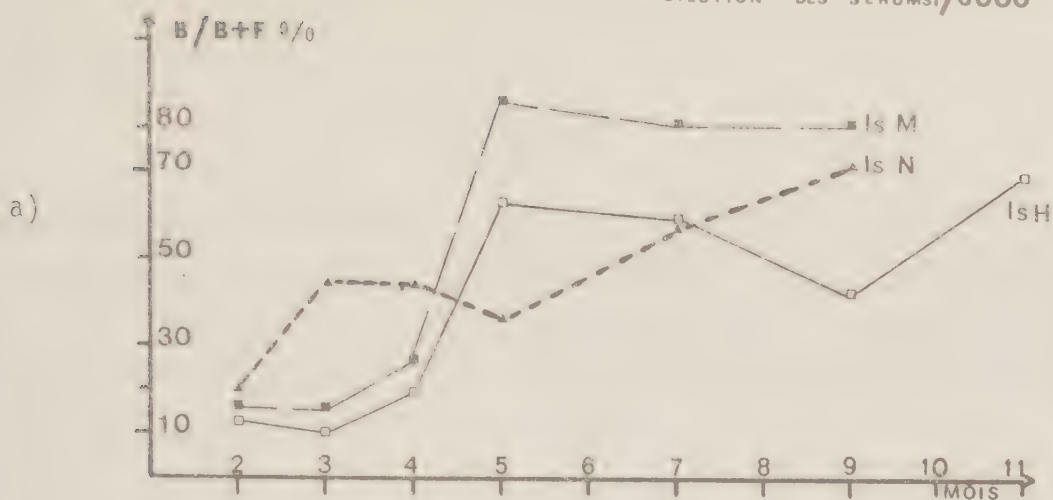
L'étude des anticorps est réalisée par la technique radio-immunologique. Le milieu d'incubation contient l'immun-sérum à tester à des dilutions croissantes dans du tampon Tris 0,05 M, EDTA 10^{-3} M pH 8,6, BSA 2 mg/essai et 50 μ l de ^{125}I LVP diluée au 1/500^e (4000 à 5000 cpm). Après 3 jours d'incubation à 4°C, l'hormone marquée libre est séparée du complexe par adsorption sur du charbon entouré de Dextran.

Pour chaque Lapin nous avons étudié :

- le taux d'anticorps en mesurant le pourcentage de fixation B/B+F lors de dilutions croissantes afin de déterminer la dilution permettant la fixation de 50% de l'hormone marquée;

ETUDE DE L'EVOLUTION DU TAUX EN ANTICORPS

DILUTION DES SERUMS 1/8000°



ETUDE DE L'IMMUNOREACTIVITE DES I.S.

SOUS UNE CHARGE CONSTANTE DE L.V.P
DE 25 Pg

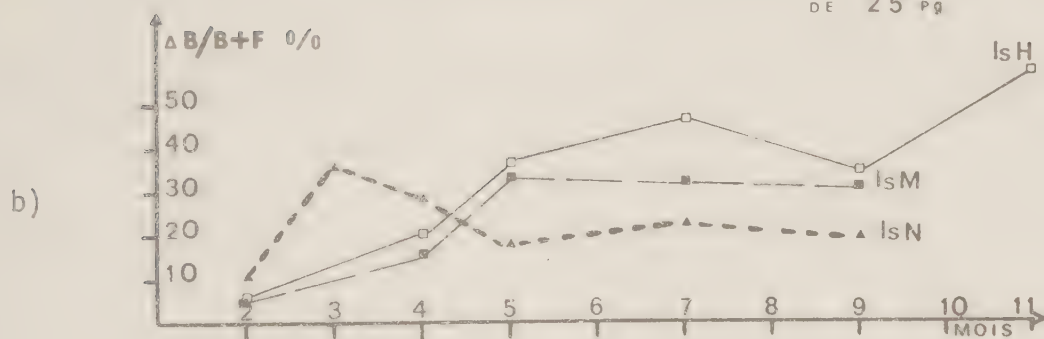


Figure 6 -

TABLEAU I

Durée d'Immunisation	Dilution donnant la meilleure sensibilité	AB/B+F + AVP froide	
		125 pg	25 pg
2ème mois (12.1.73)	1/500è final	-	1%
4ème mois (27.3.73)	1/4.000 è	7,5 %	-
5ème mois (26.4.73)	1/16.000 è	20 %	-
7ème mois (19.6.73)	1/20.000 è	22,30%	
10ème mois* (24.9.73)	1/45.000 è	-	25%

Evolution du taux de dilution et de l'immunoréactivité de l'immunsérum M
(en ajoutant une quantité donnée d'AVP) au cours des immunisations.

* L'immunsérum de Septembre 73 est celui qui a été utilisé au cours de nos essais.

- l'évolution du titre en anticorps en fonction de la durée d'immunisation;

- l'immunoréactivité des immunsérums vis à vis de la LVP, l'AVP et l'ocytocine; on détermine la variation du rapport $\Delta B/B+F$ en introduisant dans le milieu d'incubation une quantité définie de ces substances.

1/ Evolution de la formation des anticorps anti LVP -

Pour un même protocole d'immunisation, le taux en anticorps anti-LVP, l'évolution de leur formation, en fonction du temps, ainsi que leur immunoréactivité varient énormément d'un lapin à l'autre.

La figure 6 montre l'inégalité des réponses des lapins H, M, N. Dans les meilleurs cas nous avons constaté que les anticorps apparaissaient après la 5ème semaine d'immunisation, augmentant progressivement pendant 8 à 10 mois, pour diminuer ensuite .

Un exemple est donné par le tableau I qui montre l'augmentation du titre en anticorps et de l'immunoréactivité des immunsérums parallèlement aux immunisations.

2/ Immunoréactivité et mise en évidence de leur action sur l'hormone endogène et exogène -

Environ 50% des Lapins immunisés ont développé, à partir du 7ème mois, un tableau polyuro-polydipsique plus ou moins marqué après plusieurs immunisations. Les anticorps anti-LVP semblent donc être capables de neutraliser l'activité biologique de l'AVP endogène. Le sérum de ces lapins présente un taux d'anticorps relativement élevé, mais il ne semble pas exister, d'une façon constante, de corrélation parallèle entre le taux d'anticorps et leur affinité pour l'hormone comme le montre la figure 6 . L'immunsérum M présente un taux d'anticorps et une affinité plus élevée que l'immunsérum N. Par contre, l'immunsérum H présente un taux d'anticorps plus faible que M avec une affinité plus élevée.

L'apparition de diabète insipide chez des lapins immunisés contre la vasopressine a été signalée par MILLER et MOSES (1969) par MORTON et WRIGHT (1972). Ces derniers auteurs ont constaté que la polyurie et la polydipsie des animaux immunisés sont accompagnées d'une augmentation parallèle de l'affinité des anticorps. Par contre, WU et ROCKEY (1969) ont remarqué que l'affinité des anticorps n'est pas améliorée par le diabète insipide.

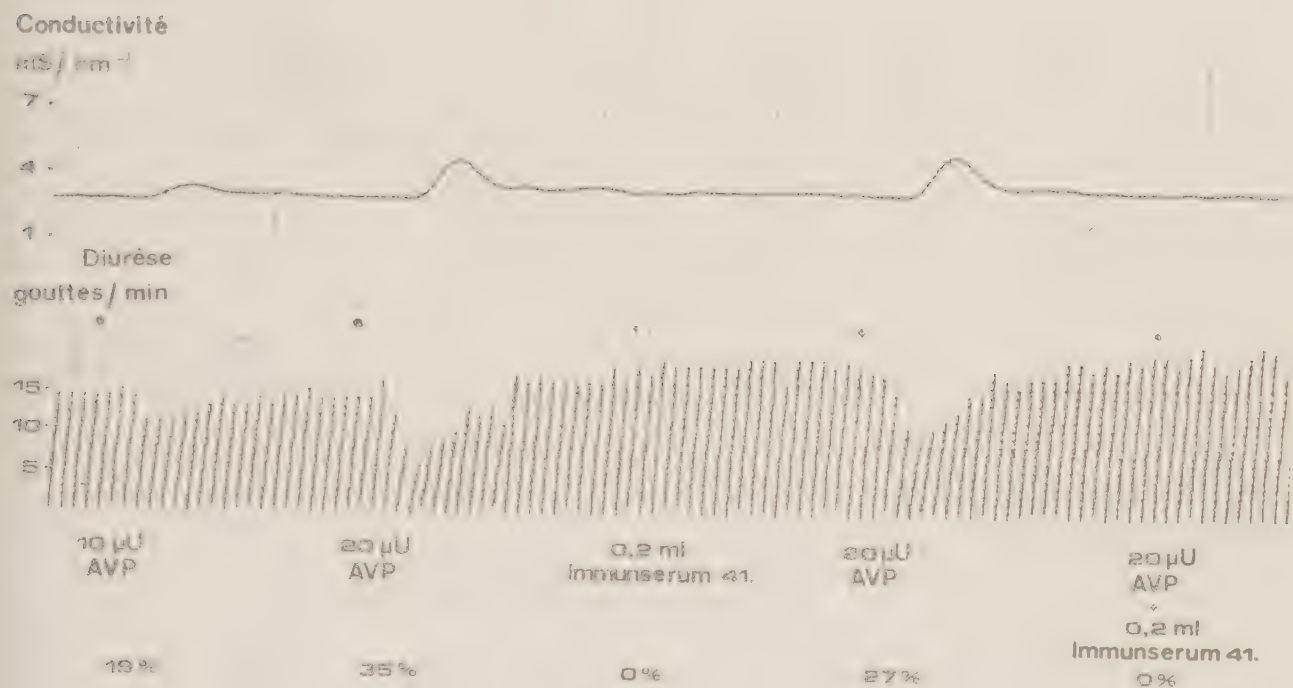


Figure 7 - Inactivation biologique de 20 μ UI d'AVP incubée en présence d'excès d'anticorps anti-LVP.

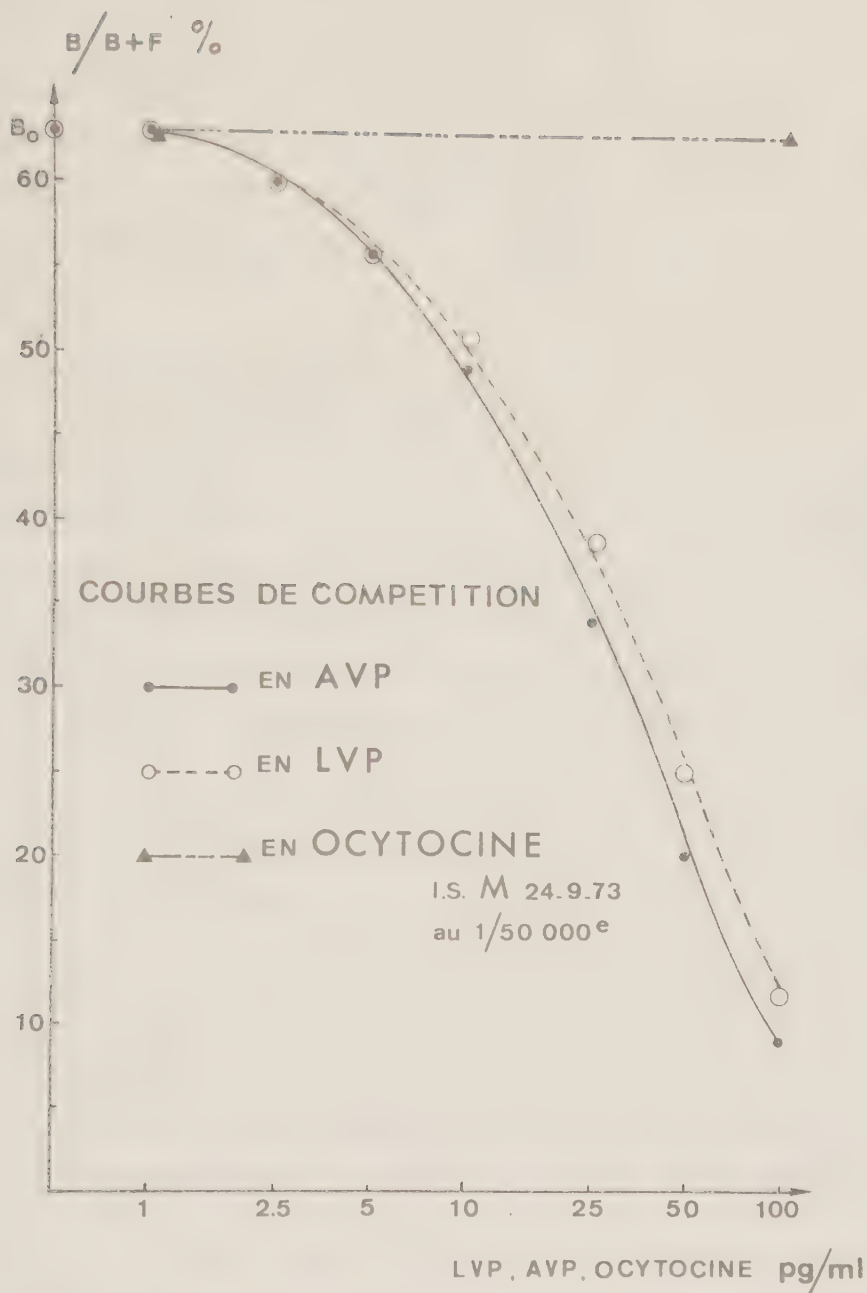


Figure 8 - Réactions croisées de l'Arg⁸-vasopressine et de l'Ile³-Leu⁸-vasopressine avec les anticorps anti-LVP.

Nous avons également vérifié que les anticorps anti-LVP sont capables d'inhiber l'activité biologique de l'ADH exogène. Nous avons utilisé le procédé de MILLER et MOSES (1969) qui consiste à incuber de l'AVP en présence d'excès d'anticorps anti-LVP à température ambiante pendant 2 heures. La figure 7 montre que la réponse antidiurétique de 20 μ UI d'AVP est totalement annulée lorsque l'hormone est préalablement incubée en présence de 0,2 ml d'immunsérum anti-LVP, alors que l'incubation de l'hormone en présence de 0,2 ml de sérum de lapin normal n'en modifie pratiquement pas l'activité biologique.

3/ Spécificité des anticorps anti-LVP -

La spécificité des anticorps obtenus a pu être testée grâce à l'emploi d'analogues structuraux de la lysine vasopressine dans lesquels un, ou deux, acides aminés sont substitués. Des quantités croissantes de différents analogues sont ajoutés au mélange réactif renfermant de la LVP marquée et l'immunsérum anti-LVP. Le degré d'inhibition de la liaison ^{125}I -LVP-anticorps observée avec les différents analogues structuraux est comparé à celui obtenu avec des quantités semblables de LVP de synthèse.

a) Réactivité de quelques analogues structuraux avec les anticorps anti-LVP -

La figure 8 montre que l'Arg⁸-vasopressine réagit de la même façon que la Lys⁸-vasopressine avec les anticorps anti-LVP. Par contre, des quantités croissantes de 0 à 250 ng d'Ile³-Leu⁸-vasopressine (ocytocine) sont incapables de déplacer l' ^{125}I -LVP de l'anticorps. La figure 9, empruntée à MARCHETTI (1975), montre qu'il faut 1000 fois plus de Ile³-Arg⁸-vasopressine (Arginine-vasotocine) et 10.000 fois plus d'ocytocine pour observer une légère réaction croisée avec les anticorps; alors que les anticorps anti-LVP reconnaissent la Phe²-Lys⁸-vasopressine, mais à un degré moindre.

De ces résultats on pourrait déduire les conclusions suivantes :

- la substitution d'un acide aminé aliphatique à la phénylalanine en position 3 empêche le peptide d'entrer en compétition avec l' ^{125}I -LVP pour se lier à l'anticorps.
- le remplacement de l'arginine en position 8 par la lysine n'empêche pas l'AVP de réagir complètement avec l'anticorps.

L'utilisation de tels immunsérums dans le dosage radioimmunologique de l'AVP, hormone naturelle chez l'Homme, est donc rendu possible par cette constatation.

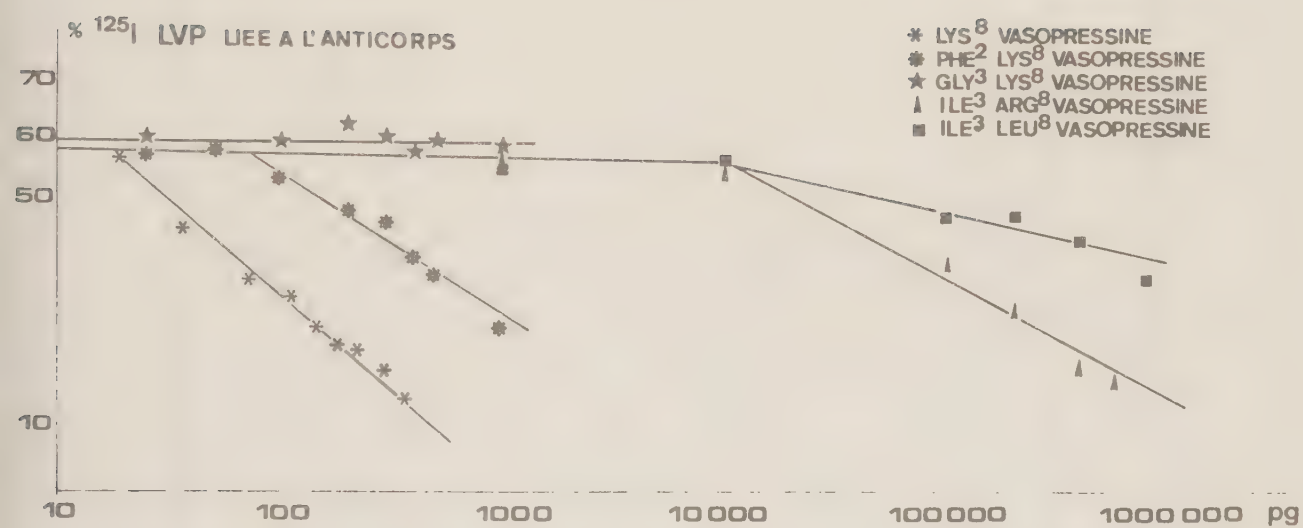


Figure 9 - Réactions croisées des différents analogues de la Lysine-Vasopressine avec un sérum anti-LVP de Lapin.

TABLEAU II

Comparaison des Activités immunologiques et biologiques de différents analogues de la lysine-vasopressine

Analogues	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Immunoréactivité (18 µg à 1000 µg)	Activité antidiurétique
Lys ⁸ -vasopressine	Cys	Tyr	Phe	Glu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly-NH ₂	100 %	100 % *
Phe ² -Lys ⁸ -vasopressine		Phe								15 à 20 %	8 % *
Gly ³ -Lys ⁸ -vasopressine			Gly							0	41 %
Ile ³ -Lys ⁸ -vasopressine			Ile							0	9,6 % *
Homova ¹⁷ 8-Lys-vasopressine							Val	Val	Lys	100 %	1,5 %
Arg ⁸ -vasopressine								Arg		100 %	167 % *
Ile ³ -Arg ⁸ -vasopressine			Ile					Arg		0	100 % *
Ile ³ -Leu ⁸ -vasopressine			Ile					Leu		0	1,9 % *
Leu ³ -Leu ⁸ -vasopressine			Leu					Leu		0	0,4 % *

Les activités de la Lys⁸-vasopressine sont prises comme références (100 p. cent)

* Les données concernant l'activité antidiurétique de ces analogues proviennent des données expérimentales de BERDE et BOISSONNAS (1968).

b) Comparaison entre immuno-réactivité et activité biologique -

Le Tableau II de BERDE et BOISSONNAS (1968), pour un immunsérum donné, résume les activités biologiques et immunologiques de quelques analogues structuraux de la lysine-vasopressine et montre que des sites différents sont impliqués dans chacun de ces cas.

En effet, la présence d'homovaline en position 7 et 8 ne modifie pas l'immunoréactivité mais réduit considérablement la réponse antidiurétique. D'autre part, l'AVP, qui est biologiquement plus active que la LVP, est reconnue de la même façon par les anticorps. Il en est de même pour l'arginine vasotocine; cette molécule ne croise avec la LVP qu'à des concentrations très élevées, mais possède un pouvoir antidiurétique comparable à celui de la LVP.

Aucune corrélation ne paraît donc possible entre activité biologique et immunologique : ceci pourrait tenir au fait que l'activité biologique et la réactivité immunologique sont soutenues par des sites actifs différents.

Cette étude suggère que le noyau phénylalanine en 3 est indispensable à l'activité antigénique de l'hormone. VORHERR et MUNSICK (1970) considèrent que ce résidu est un fragment essentiel du site antigénique du peptide.

CZERNICHOW et coll. (1974) ont mis en évidence plusieurs sites antigéniques sur la molécule de vasopressine; en comparant deux immunsérums provenant d'animaux immunisés selon deux procédés différents. Dans un premier cas, et pour un processus d'immunisation analogue au nôtre (liaison de LVP avec de la sérumalbumine bovine), le couplage entre l'anticorps et la LVP se fait par la partie cyclique du peptide. Dans le second cas, lorsque l'on utilise de charbon comme support de la LVP lors de l'immunisation, le site immuno-réactif se situe sur les deux derniers acides aminés.

Une telle corrélation entre spécificité immunologique et processus d'immunisation ne peut être encore reconnue. En effet, tous nos immunsérums réagissent avec l'AVP et la LVP, mais l'immunoréactivité vis à vis des deux molécules est très inégale pour certains de ces immunsérums, comme le montre la figure 10. OYAMA et coll. (1971) ont également observé, chez des lapins immunisés avec de la LVP couplée à la BSA, la formation d'anticorps capables de distinguer la LVP de l'AVP.

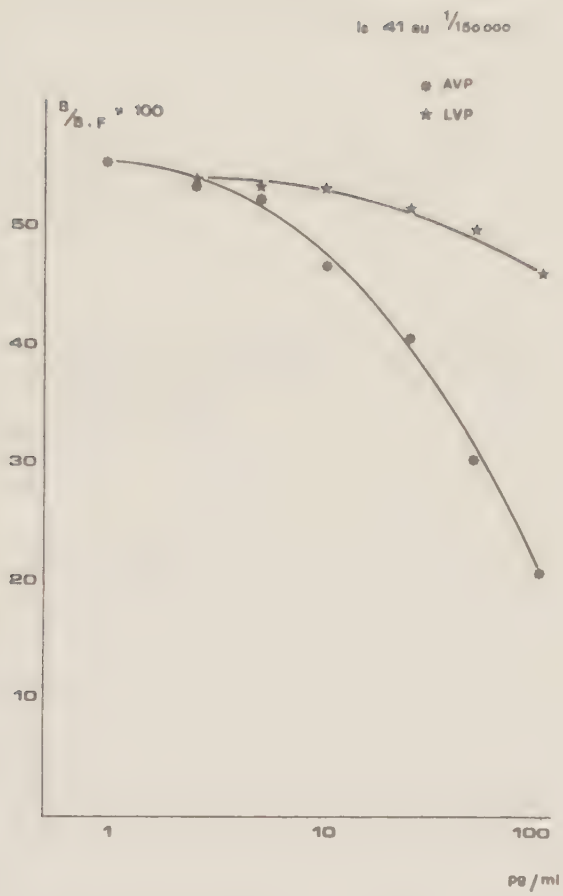


Figure 10 - Inégalité d'immunoréactivité d'un immunsérum anti-AVP vis à vis de la LVP et de l'AVP.

CHAPITRE IV

EXTRACTION DE L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE URINAIRE

Avant le dosage, une extraction préalable est indispensable : elle a le double but de concentrer l'hormone et de supprimer les interférences non spécifiques observées lorsque l'on ajoute directement l'urine dans le milieu réactionnel.

Des expériences préliminaires, effectuées au laboratoire, ont montré que, s'il était indispensable de placer les échantillons urinaires à 4°C aussitôt après la miction, il n'était pas nécessaire de procéder à une acidification des urines dès leur recueil.

Comme le montre le Tableau III, sur le plan pratique, il n'est donc pas nécessaire d'exiger une acidification des urines lorsque celles-ci sont recueillies chez des malades en milieu hospitalier. Outre une simplification des prélèvements, cela évite une acidification trop forte, non ou mal contrôlée, qui semble plus favorable à la dégradation de l'hormone qu'à sa stabilité.

Par contre, après la période de recueil, les urines sont acidifiées à pH 4,5 avec de l'acide acétique avant d'être congelées à -20°C jusqu'au jour de l'extraction et du dosage.

Les principales techniques d'extraction de l'ADH sont résumées sur le tableau IV.

Nous avons utilisé la technique de MILLER et MOSES (1971) légèrement modifiée dans notre laboratoire. Elle repose sur la fixation de l'hormone à pH 4,5 sur une colonne (1 x 2 cm) d'Amberlite CG50 ramenée sous la forme H^+ selon le procédé de HIRS, MOORE et STEIN (1953). 20 ml d'urine sont passés sur Amberlite, la fixation d'ADH est suivie de deux lavages par 10 ml d'eau à pH 4,5, puis par 10 ml d'éthanol 50%. L'élution est réalisée par passage de 15 ml d'éthanol 75% à pH 1,6 dans des ballons siliconnés. Les éluats sont évaporés à sec à 0° et sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

TABLEAU III

Taux d'ADH urinaire mUI/24 heures suivant que les urines sont acidifiées ou non au cours de la période de recueil.

(chaque miction a été divisée en 2 portions : l'une acidifiée, l'autre non).

	Recueil des urines de 24 h. sur acide acétique pH 4,5	Recueil des urines de 24 h. sans acidification
C.G.	18,64 $\pm$ 0,64 mUI/24 h (n = 10)	16,64 $\pm$ 1,15 mUI/24 h. (n = 8)
G.G.	29,78 $\pm$ 0,48 mUI/24 h (n = 6)	32,81 $\pm$ 1,11 mUI/24 h (n = 7)

TABLEAU IV

Principales méthodes d'extraction urinaire de l'hormone antidiurétique

AUTEURS	Volume de départ	Technique
OYAMA & coll. (1971)	-	pas d'extraction
BOYD & coll. (1972)	5 ml	Sphérosil
MILLER & MOSES (1972)	25 ml	Amberlite CG50
LEGROS & coll. (1973)	2 ml	Chromatographie sur G ₂₅
MERCKELBACH & coll. (1975)	25 ml	Amberlite CG50
FREISENHAUSEN & coll. (1976)	0,4 ml	pas d'extraction

_ METHODOLOGIE _

**URINES ACIDIFIEES A PH 4,5 AUSSITOT APRES
LE RECUEIL PUIS CONGELEES**

EXTRACTION

**PASSAGE SUR AMBERLITE CG 50 (COLONNE DE 2 CM) DE
20 ML D'URINE**

LAVAGE AVEC 10 ML D'EAU DISTILLEE PH 4,5

LAVAGE AVEC 10 ML D' ETHANOL 50%

ELUTION AVEC 20 ML D' ETHANOL 75% PH 1,6

EVAPORATION DES ELUATS A 37°

**EXTRAITS REDISSOUS AU MOMENT DU RID DANS 2 ML
DE TAMPON .**

TABLEAU V

Les extraits sont repris dans 2 ml de tampon Tris EDTA pH 8,6 et sont testés sous quatre volumes différents (25, 50, 100, 200 μ l) afin de vérifier le parallélisme de la courbe obtenue avec la courbe de compétition. Toutes les extractions sont faites en double pour s'assurer de la reproductibilité de chaque dosage (voir Tableau V).

Le rendement d'extraction de l'ADH urinaire sur Amberlite a été déterminé dans des conditions expérimentales différentes (Tableau VI) :

- des échantillons de 10 ml d'urine "sans AVP" (passés sur Amberlite pour fixer l'ADH) chargés avec 100 μ l de 125 I LVP puis dosés, donnent un rendement d'extraction de $95,6 \% \pm 8,6 \%$

- des échantillons de 20 ml d'urine "sans AVP" chargés avec des quantités différentes d'AVP de synthèse donnent des rendements de $103,4 \% \pm 9,7 \%$ pour une charge de 12,5 μ UI, $86,3 \% \pm 8,2 \%$ pour une charge de 25 μ UI et $85,8 \% \pm 10,2 \%$ pour une charge de 50 μ UI.

- pour des échantillons de 20 ml d'urine non débarrassés d'AVP et chargés avec 25 UI d'AVP de synthèse, le rendement d'extraction est de $94,7 \% \pm 9,7 \%$.

- des échantillons d'urine de sujets atteints de diabète insipide, chargés avec la même quantité d'AVP de synthèse donnent des rendements d'extraction non reproductibles et souvent supérieurs à 100 %. Ceci est vraisemblablement lié à l'importante hypotonie des urines qui modifient la fixation de l'AVP sur Amberlite.

Ces rendements d'extraction sont supérieurs à ceux trouvés par les autres auteurs puisque les derniers sont compris entre 60 et 80 %.

TABLEAU VI

Rendement d'extraction de l'ADH urinaire

Conditions Expérimentales	Rendement d'extraction	
10 ml d'urine chargés avec 100 μ l de ^{125}I -LVP	95,6% $\pm$ 8,6*	(n=10)
20 ml d'urine "sans AVP" chargés avec 12,5 μ UI d'AVP de synthèse	103,4% $\pm$ 9,7	(n=8)
20 ml d'urine "sans AVP" chargés avec 25 μ UI d'AVP de synthèse	86,3% $\pm$ 8,2	(n=8)
20 ml d'urine "sans AVP" chargés avec 50 μ UI d'AVP de synthèse	85,8% $\pm$ 10,2	(n=10)
20 ml d'urine** de 24 h. chargés avec 50 μ UI d'AVP de synthèse	94,7% $\pm$ 9,7	(n=10)

* SD : écart type

** urine non débarrassée d'AVP

CHAPITRE V

PROTOCOLE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'AVP URINAIRE

A - REACTIFS UTILISES (Tableau VII) -

- Tampon : la réaction s'effectue dans un milieu Tris, EDTA à pH 8,6 en présence de 2 mg de BSA par essai.

- La vasopressine marquée : la ^{125}I LVP, conservée à -20°C , est diluée juste avant l'emploi dans le tampon précité de manière à avoir 4000 à 5000 cpm dans 50 μl .

- L'AVP de synthèse (Ferring) : répartie dans des tubes sous 100 à 200 μl est conservée à -20°C jusqu'à l'emploi. Les concentrations finales allant de 1 pg à 250 pg/ml sont préparées dans du tampon au cours de chaque expérience.

- Anticorps anti-LVP : les immunosérums conservés à -20°C par fractions de 100 à 200 μl sont dilués juste avant l'emploi dans du tampon; la dilution d'immunosérum nécessaire pour fixer 50% de l'hormone marquée est déterminée au cours d'une expérience préliminaire.

- Charbon NORIT A (Sigma) à 2,5 % + Dextran 0,25 % pour séparer l'hormone libre de l'hormone liée aux anticorps.

B - CHOIX DE LA DILUTION D'IMMUNSERUM -

BERSON et YALOW (1964) ont démontré que le maximum de sensibilité* est obtenu lorsque l'immunosérum est employé à une dilution telle que la fraction d'hormone liée à l'anticorps (en l'absence d'hormone froide) est égale à 0,33, c'est-à-dire que le rapport hormone liée/hormone libre est égal à 0,5. Ces auteurs montrent que lorsque le rapport est égal à 1,5, la sensibilité diminue très faiblement mais qu'elle n'est plus que de moitié si le rapport atteint une valeur de 2

Pour les immunosérums dont nous disposons, nous avons remarqué que le maximum de sensibilité est atteint lorsque le pourcentage d'hormone marquée liée aux anticorps est de $55\% \pm 5\%$. Pour déterminer ce pourcentage l'antisérum, à différentes dilutions, est mis à incuber pendant trois jours

* voir plus loin la définition de la sensibilité

SYSTEME DU RID

utilisé au laboratoire

* TAMPON TRIS HCl 0,05 M
 EDTA 10^{-3} M
 BSA 0,2 %
 pH 8,6

* VOLUME de L'ESSAI 1 ml

* INCUBATION 3 jours à 4°C

* SEPARATION CHARBON DEXTRAN 70
 2,5 % 0,25 %
 0,5 ml/tube

TABLEAU VII

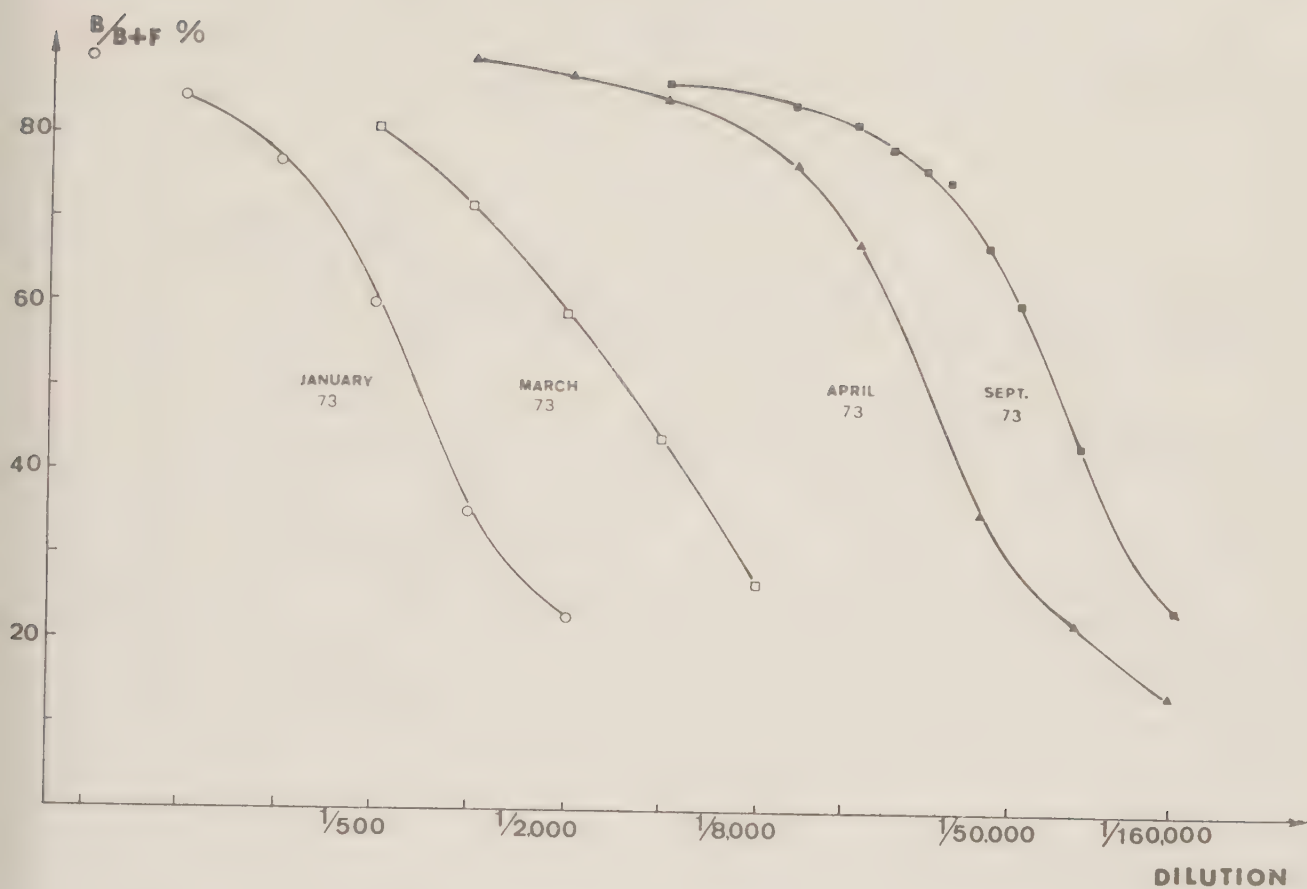


Figure 11 - Courbe de dilution de l'immunsérum M. en fonction de la durée d'immunisation.

L'immunsérum employé est celui de Septembre 73 qui permet une fixation de 50 ± 10 p. 100 de l'hormone marquée à l'anticorps pour la dilution $\frac{1}{50,000}$.

à 4°C sous un volume final de 1 ml contenant une quantité constante de ^{125}I -LVP (4000 à 5000 cpm). Dans ces conditions, aux faibles dilutions de l'antisérum, la ~~proportion~~ ^{quantité} de la radioactivité est liée au complexe, pour des dilutions croissantes, le pourcentage de l'hormone marquée fixée diminue. Il est simple de déterminer graphiquement la dilution d'immunsérum pour laquelle 50% de l'hormone marquée sont liés à l'anticorps. La figure 11 montre que, pour l'immunsérum M utilisé depuis le début du dosage, cette dilution est de 1/50.000°.

C - MELANGE REACTIF -

Les différents réactifs sont maintenus au froid. La réaction s'effectue dans des tubes en verre placés dans un bac à glace. On ajoute successivement :

- Tris EDTA pH 8,6 : de 500 à 700 μl en fonction du volume de l'extrait à doser
- 100 μl de BSA à 20 mg/ml
- 100 μl d'immunsérum anti-LVP dilué au 1/50.000
- l'extrait inconnu à doser sous 4 volumes différents : 25, 50, 100 et 200 μl
- pour la courbe étalon on ajoute 50 μl de solution standard d'AVP à des dilutions allant de 1 pg à 250 pg/tube (de 0,4 μUI à 100 μUI /tube)
- 100 μl de ^{125}I LVP (4000 à 5000 cpm).

Le volume final est de 1 ml pour tous les tubes. Tous les tubes sont faits en double pour s'assurer de la reproductibilité de chaque essai. Les tubes sont agités, recouverts de "parafilm" et mis à incuber à 4°C pendant 3 jours, temps au bout duquel est réalisé l'équilibre entre la forme liée et la forme libre.

La cinétique de formation du complexe Ag-Ac dépend de plusieurs paramètres :

1/ Choix de la durée d'incubation -

Le temps d'incubation a été choisi au cours d'expériences précédentes effectuées dans les conditions habituelles en l'absence d'hormone froide (B_0) et en présence d'une quantité donnée de celle-ci. On remarque que le pourcentage d'hormone liée à l'anticorps augmente rapidement au cours des premières heures, puis, très lentement, à partir de la 48ème heure.

Nous avons fixé la durée d'incubation à 72 heures mais des incubations plus prolongées augmentent légèrement le rapport B/B+F (fig. 12).

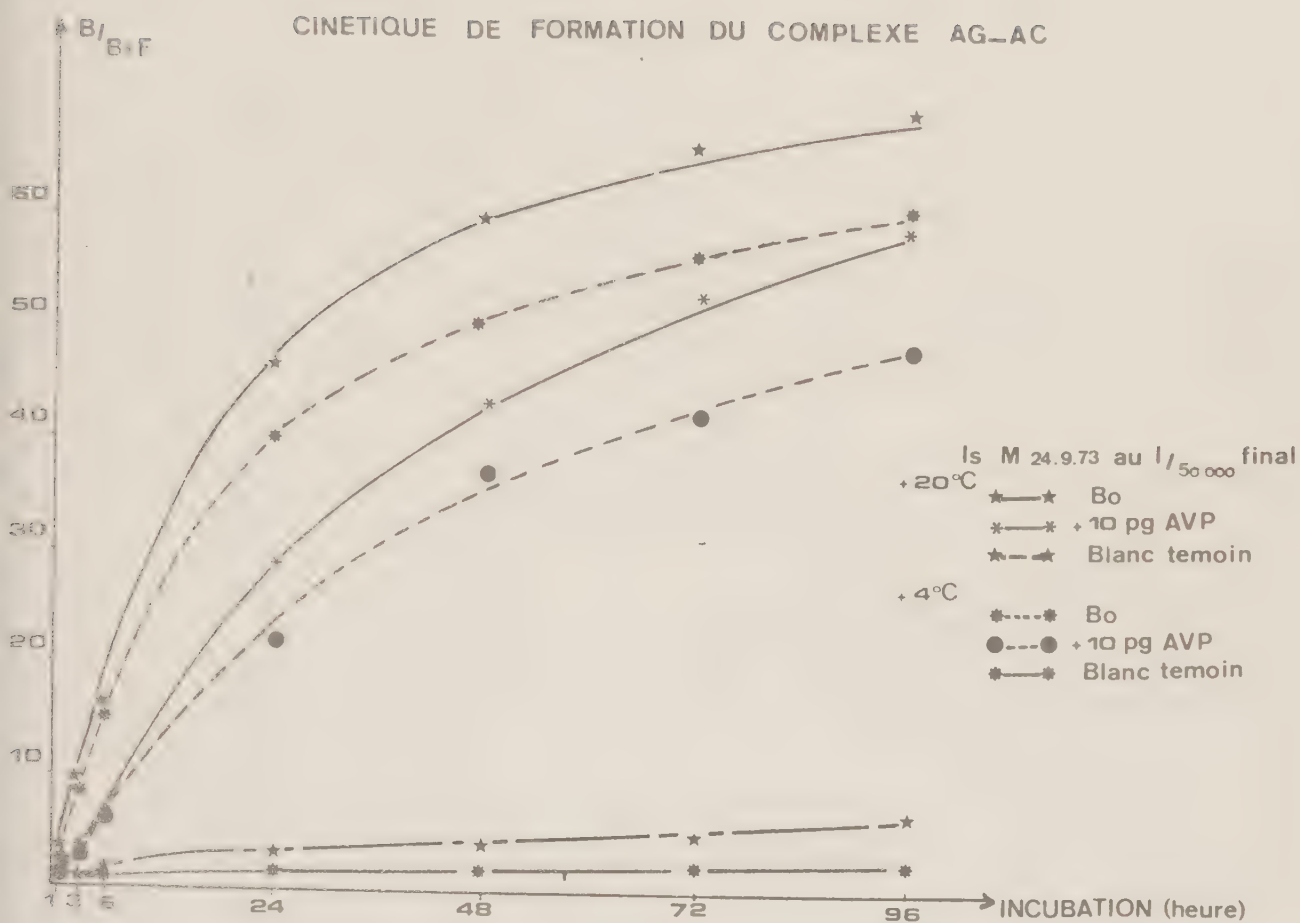


Figure 12 - Cinétique de la formation du complexe Ag-Ac.

La réaction s'effectue à 4° et à 20°C en l'absence d'hormone froide (B_0) et en présence de 10 pg d'AVP pour une quantité constante de ^{125}I -LVP et d'anticorps (immunsérum M au 1/50.000°).

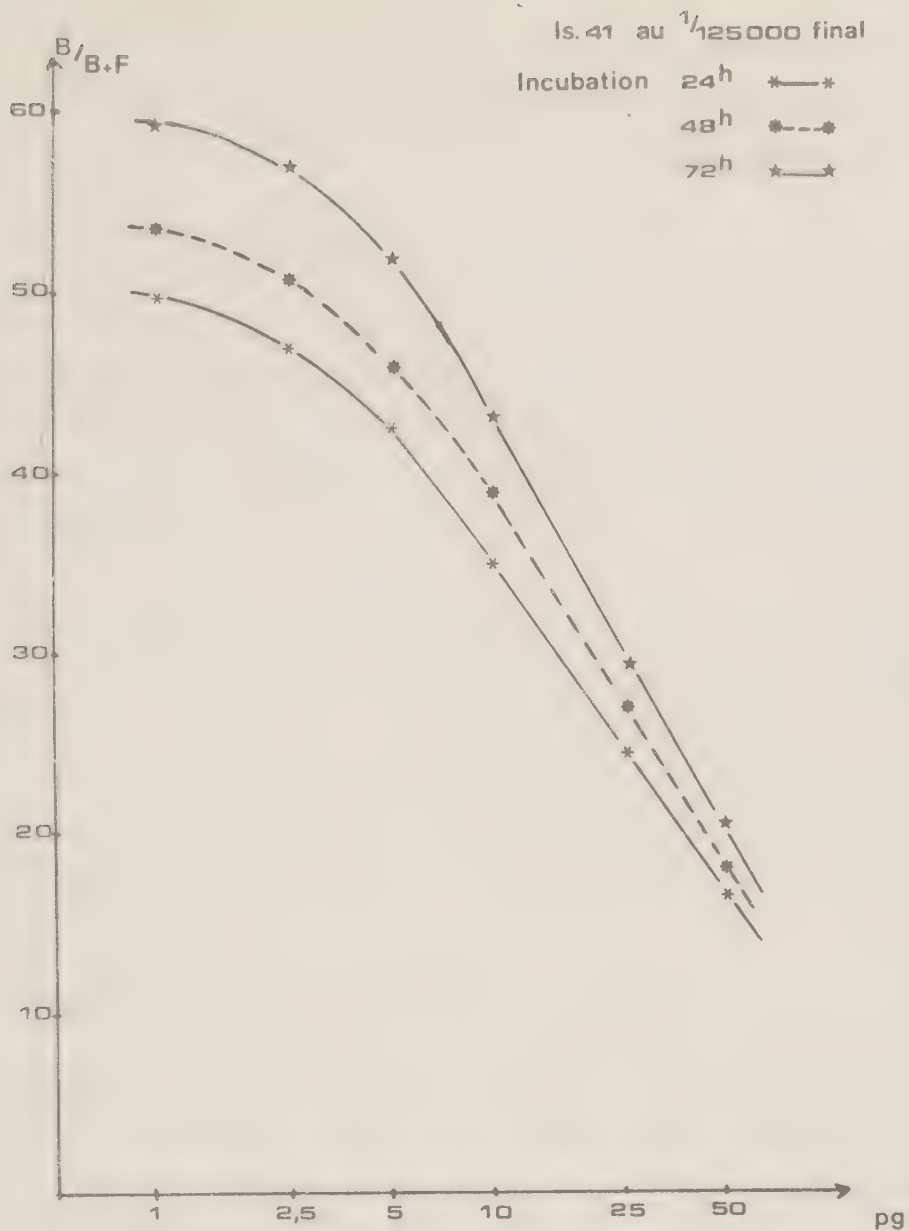


Figure 13 - Evolution, en fonction du temps, de la réaction antigène-anticorps. La réaction s'effectue à 4°C pendant 24, 48 et 72 heures en présence d'une quantité constante de ^{125}I -LVP et d'anticorps et de quantités croissantes d'AVP (immunsérum 41 au $1/125.000^\circ$).

La figure 13 montre le décalage des courbes de compétition en fonction de la durée d'incubation pour un autre immunsérum.

2/ Choix de la température d'incubation -

Comme le montre la figure 12, la cinétique de formation du complexe Ag-Ac est plus rapide à 20°C qu'à 4°C. On remarque, par ailleurs, que pour la même durée d'incubation le pourcentage de l'hormone liée est plus élevé à 20°C, mais avec une élévation parallèle de la valeur du blanc témoin. C'est pour cette dernière raison que nous avons fixé la température d'incubation à 4°C.

3/ Choix du volume final d'incubation -

Dans les conditions d'incubation précitées, le pourcentage de l'hormone liée à l'anticorps est modifié par le volume final d'incubation.

La figure 14 montre que pour un volume final de 1 ml la valeur du B_0 est de 60 % pour 3 jours d'incubation contre 47 % pour un volume final de 0,5 ml et pour la même durée d'incubation, alors que la valeur du blanc témoin est non modifiée.

4/ Choix du pH optimum de formation du complexe -

Une variation du pH du tampon de 6 à 9 montre que le pourcentage de la fraction liée augmente pour atteindre un maximum à pH 8,4 - 8,6 (fig. 15). On remarque, également, qu'avec une charge de 150 pg d'AVP de synthèse, on a une diminution plus importante du rapport $B/B+F$ pour un pH de 8,4-8,6, donc une meilleure sensibilité.

D - SEPARATION DE L'HORMONE LIBRE DE L'HORMONE LIEE A L'ANTICORPS -

Les techniques utilisées sont nombreuses et de principe très différent.

1/ Principales techniques utilisées -

- Migration électrophorétique :

elle est basée sur la migration électrique différente de l'hormone libre et du complexe hormone-anticorps. On peut citer la chromatographie électrophorèse et l'électrophorèse sur acétate, gel d'amidon ou gel de polyacrilamide.

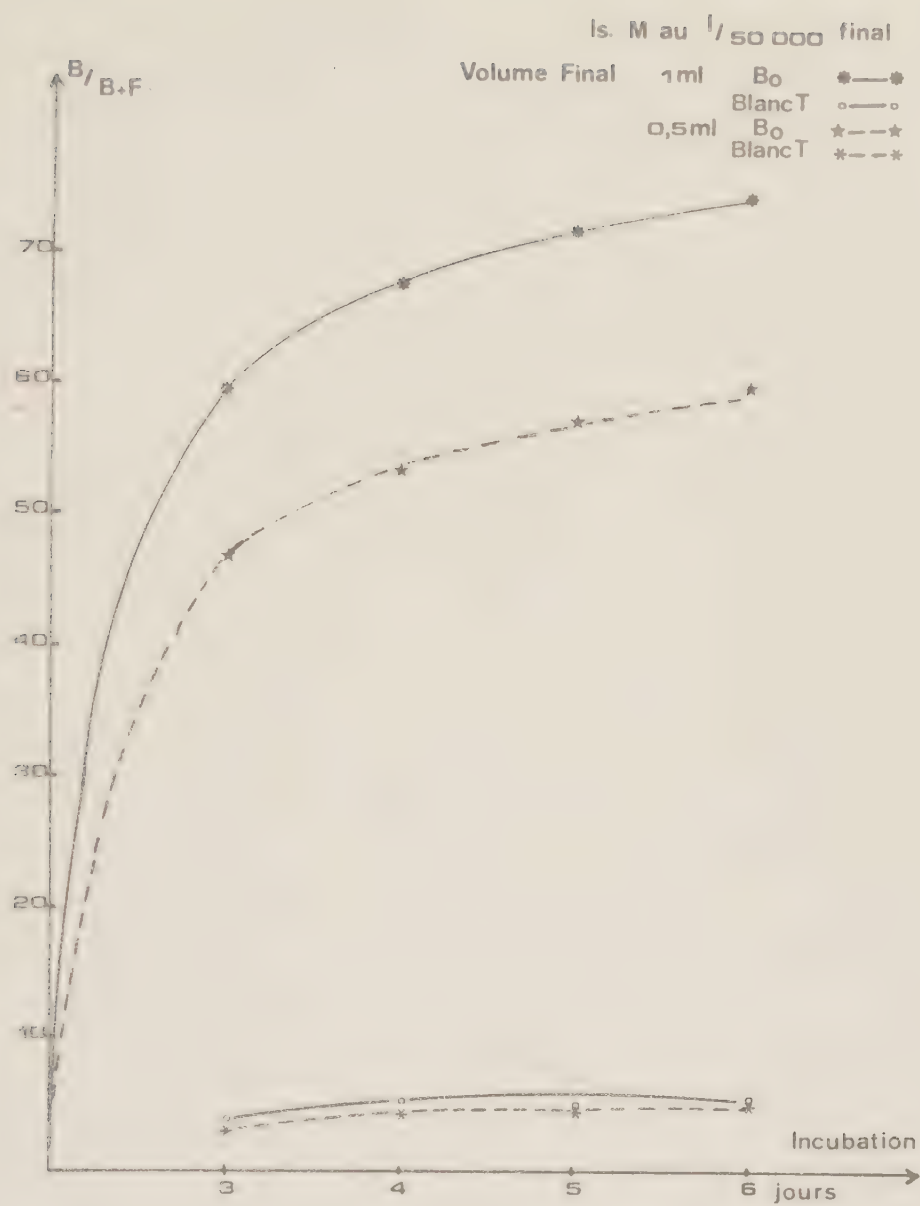


Figure 14 - Influence du volume final sur la réaction Ag-Ac.

La réaction s'effectue à 4°C pour une quantité constante d' 125 I-LVP et d'anticorps.

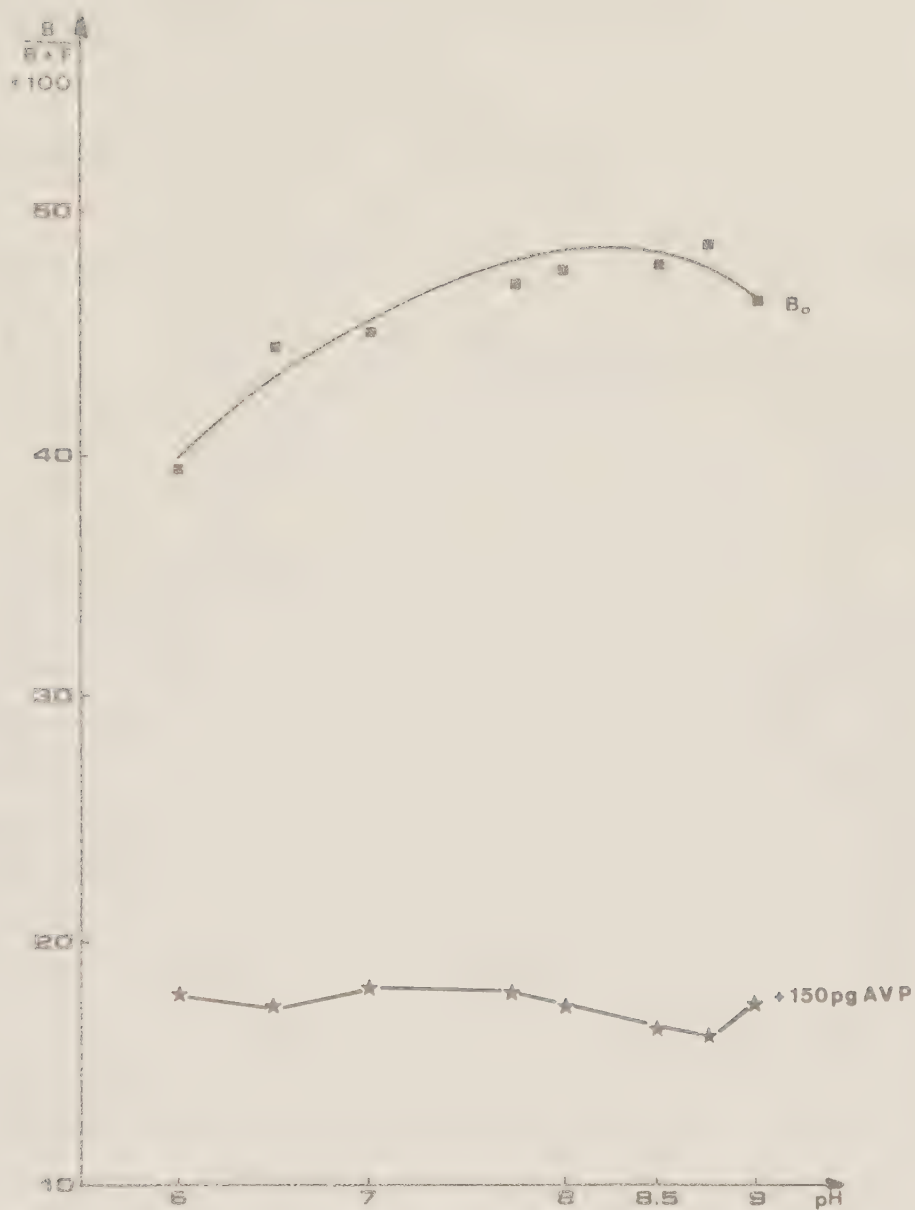


Figure 15 - Influence du pH d'incubation sur la réaction Ag-Ac pour une quantité constante d' ^{125}I -LVP et d'anticorps en l'absence d'AVP de synthèse (B_0) et en présence d'une charge de 150 pg d'AVP.

- L'immunoprécipitation :

le procédé repose sur la précipitation du complexe Ag-Ac par un sérum anti-gamma-globuline rendant la séparation possible.

- Précipitation du complexe par une solution semi-saturée de sulfate d'ammonium ou différents solvants organiques.

- Fixation de l'anticorps sur un substrat solide par adsorption sur des disques de polystyrène, les parois de tubes en verre, en plastique ...

- Adsorption de l'hormone libre sur un substrat solide :

l'hormone libre est adsorbée sur une structure solide qui peut être centrifugée tandis que le complexe Ag-Ac reste dans le surnageant. On peut utiliser comme support : des silicates, talc, kaolin, charbon ...

L'adsorption sur charbon de bois a été proposée pour l'insuline puis pour d'autres hormones par HERBERT et coll. (1965). Elle a été mise au point pour l'angiotensine par BOYD (1969) et utilisée pour la LVP par MENARD et MILLIEZ (1970). Le Charbon est entouré de Dextran; le Dextran est un polymère glucidique composé presque exclusivement de glucose lié par des liaisons α 1.6-glucosidiques. En présence de particules de charbon qui se comportent comme des micro-éponges solides, le Dextran enrobe ces particules et forme une couverture jouant le rôle d'un tamis moléculaire d'une taille telle que seules les petites molécules peuvent se fixer. Le charbon adsorbant non spécifique est rendu spécifique par l'addition de Dextran.

Nous utilisons le Charbon NORIT A (Sigma) entouré de Dextran T70 (Pharmacia) qui adsorbe l'AVP libre et exclut l'hormone liée aux anticorps. Le mélange est préparé extemporanément dans du Tris EDTA pH 8,6 dans les proportions de 2,5 % Charbon, 0,25 % Dextran. L'ensemble est laissé incubé pendant 30 minutes à 4°C.

A chaque tube réactionnel on ajoute 0,5 ml de cette suspension. Les tubes sont immédiatement agités puis centrifugés pendant 10 minutes à 5000 tours/min. après un temps de contact de 2 minutes.

Le surnageant contenant l'hormone liée est séparé du culot, contenant l'hormone libre. L'activité des deux fractions est mesurée au compteur gamma, ceci permet de déterminer le rapport B/B+F.

2/ Importance du temps de contact et de la température sur la séparation -

Nous avons étudié la variation du rapport $B/B+F$ en fonction du temps de contact du mélange Charbon-Dextran en l'absence d'hormone froide. En effet, le charbon adsorbant l'hormone libre a tendance à déplacer l'équilibre dans le sens de la dissociation du complexe, entraînant une diminution du rapport $B/B+F$ puisque l'hormone marquée, libérée du complexe, vient alors se fixer sur le charbon.

La figure 16 montre que l'adsorption est instantanée. Mais l'on constate, au niveau de la courbe blanc témoin, que la valeur du rapport $B/B+F$ est de 6% au bout de 30 secondes de contact et qu'elle n'est plus que de 4% au bout de 2 minutes de contact. Il faut donc un temps minimum de contact pour que toute l'hormone libre s'adsorbe sur le charbon.

Il faut noter également l'importance de la température sur la dissociation du complexe Ag-Ac. Le phénomène de dissociation à 4°C est plus lent qu'à la température ambiante.

Chaque immunosérum semble se comporter différemment avec le charbon et il est nécessaire de vérifier pour chaque nouvel immunosérum le temps de contact permettant d'avoir la valeur la plus faible du blanc témoin.

Pour l'immunosérum que nous utilisons depuis le début du dosage, ce temps de contact a été fixé à 2 minutes.

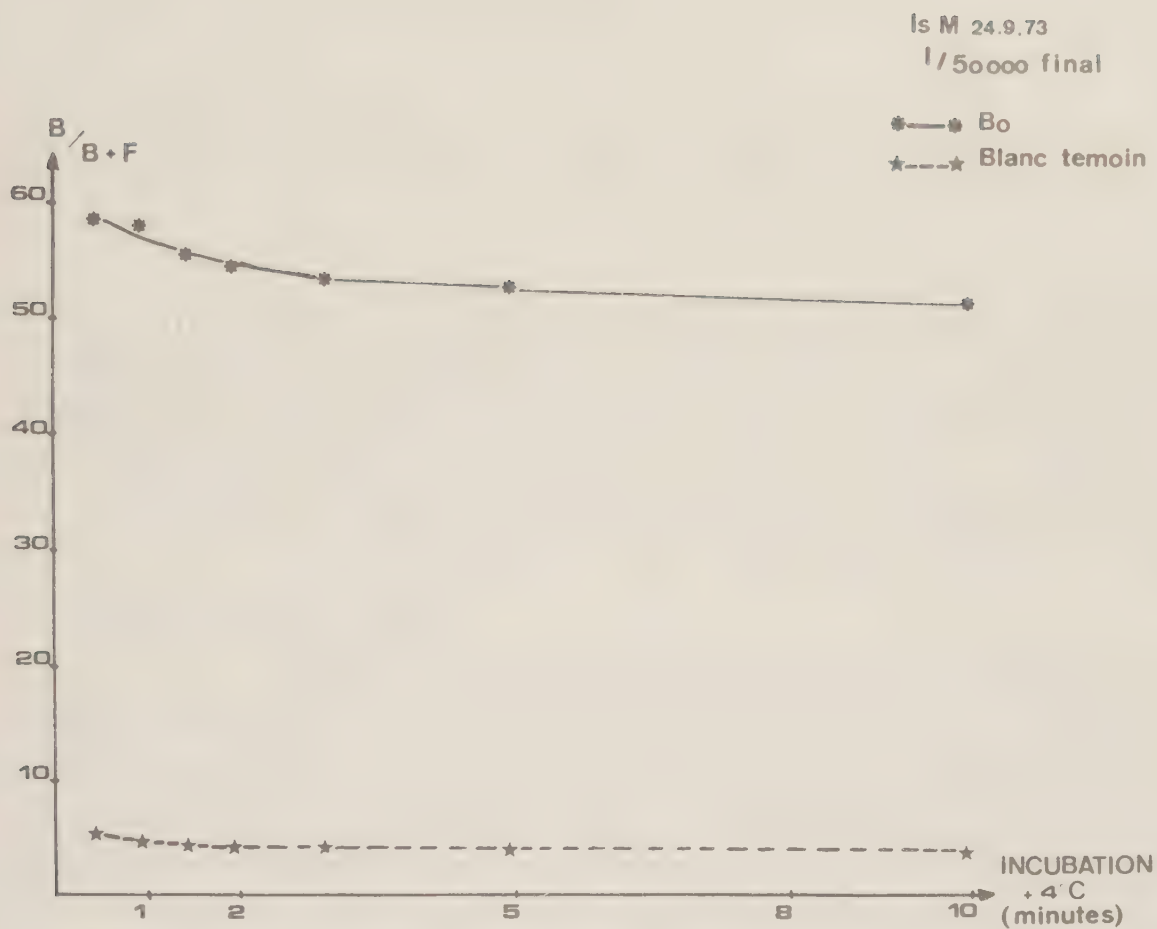


Figure 16 - Importance du temps de contact avec le charbon sur la séparation de l'hormone libre de l'hormone liée aux anticorps.

CHAPITRE VI

DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE

Malgré sa réalisation complexe et une interprétation difficile, le dosage biologique est encore utilisé dans le Laboratoire pour les dosages plasmatiques de l'activité antidiurétique. Nous avons également utilisé cette technique pour l'étude des propriétés de l'hormone marquée et l'établissement de la corrélation : dosages biologiques, dosages radioimmunologiques.

A - PREPARATION DES ANIMAUX -

La technique utilisée est celle décrite par JEFFERS et coll. (1942), mise au point dans le laboratoire par GHARIB et coll. (1967). L'animal réactif de choix est le Rat en surcharge hydrique, anesthésié à l'éthanol, pesant entre 200 et 300 g, à jeun depuis 18 heures environ, mais normalement hydraté. On pratique un premier gavage avec une solution d'eau et d'alcool à 12 % mélangés à volume égal. La quantité administrée correspond à 5% du poids corporel de l'animal; 45 minutes plus tard, on recommence l'opération avec une quantité égale à 3% du poids corporel.

Après 10 à 15 minutes, lorsque la narcose est suffisamment profonde, on entreprend la préparation chirurgicale de l'animal : la veine jugulaire est dénudée et cathétérisée, une sonde vésicale est ensuite mise en place par cystostomie. Les plaies sont soigneusement suturées et l'animal est laissé reposant sur la face ventrale. Toutes ces opérations sont réalisées en manipulant le moins possible les organes avoisinants afin d'éviter une hypersécrétion d'hormone antidiurétique. Lorsque l'urine apparaît à l'extrémité de la sonde vésicale celle-ci est reliée, par l'intermédiaire d'un tube en polyéthylène, à la cellule de conductivité et à un compte-gouttes. Pour ce dernier on utilise des artifices pour augmenter le nombre de gouttes : l'urine de Rat arrive dans un flacon contenant une solution alcoolique à 50% et chasse une quantité équivalente de ce liquide. Les gouttes sont enregistrées par une cellule photoélectrique, les variations de conductivité grâce à un conductivimètre.

Enfin, pour maintenir une surcharge hydrique constante l'animal est perfusé à un débit moyen de 0,1 ml par minute avec une solution contenant 0,3 % de chlorure de sodium, 1,67 % de glucose et 1,2 % d'éthanol.

B - CONDUITE DU DOSAGE -

Le dosage ne peut être effectué que lorsque la diurèse est stable et supérieure à 6 ml/heure soit environ 8 gouttes/minute. On utilise un "essai à quatre points" : chaque rat reçoit 2 doses standards et 2 doses de l'extrait à concentration inconnue; ces doses étant dans le même rapport en général 1/2 (fig. 17).

Les solutions standards employées sont préparées à partir de solutions mères d'AVP de synthèse (Ferring) ou LVP de synthèse (Sandoz) à 10 UI/ml.

Standard et extrait sont injectés dans le cathéter mis en place dans la veine jugulaire. Pour cela, la perfusion est interrompue quelques instants puis réinstallée immédiatement après l'injection, le perfusat permettant de laver les espaces morts constitués par l'aiguille et le cathéter.

La réponse antidiurétique est exprimée en pourcentage de la réduction de la diurèse en prenant comme référence la diurèse des six minutes précédant l'injection et celle de la 2ème à la 8ème minute après l'injection. Il est alors possible de tracer les courbes "effet-dose" se rapportant à la solution étalon et à l'échantillon inconnu (fig. 18).

Pour la conductivité, on utilise comme référence la surface comprise sous la courbe de conductivité. L'effet (conductivité et antidiurèse) est proportionnel au logarithme du standard (SCHILD, 1942).

La sensibilité du dosage varie d'une préparation à l'autre; les concentrations plasmatiques en AVP étant faibles, on ne pourra utiliser que des préparations capables de détecter 5 à 10 μ UI d'AVP.

En outre, pour déceler la présence d'hormone dans les extraits à doser, on est parfois obligé d'injecter à l'animal des volumes de 0,25 à 0,5 ml d'extrait. Dans ce cas, il est nécessaire de s'assurer que le volume injecté ne perturbe pas la réponse antidiurétique : l'extrait à doser et la solution standard devront être injectés sous un même volume.

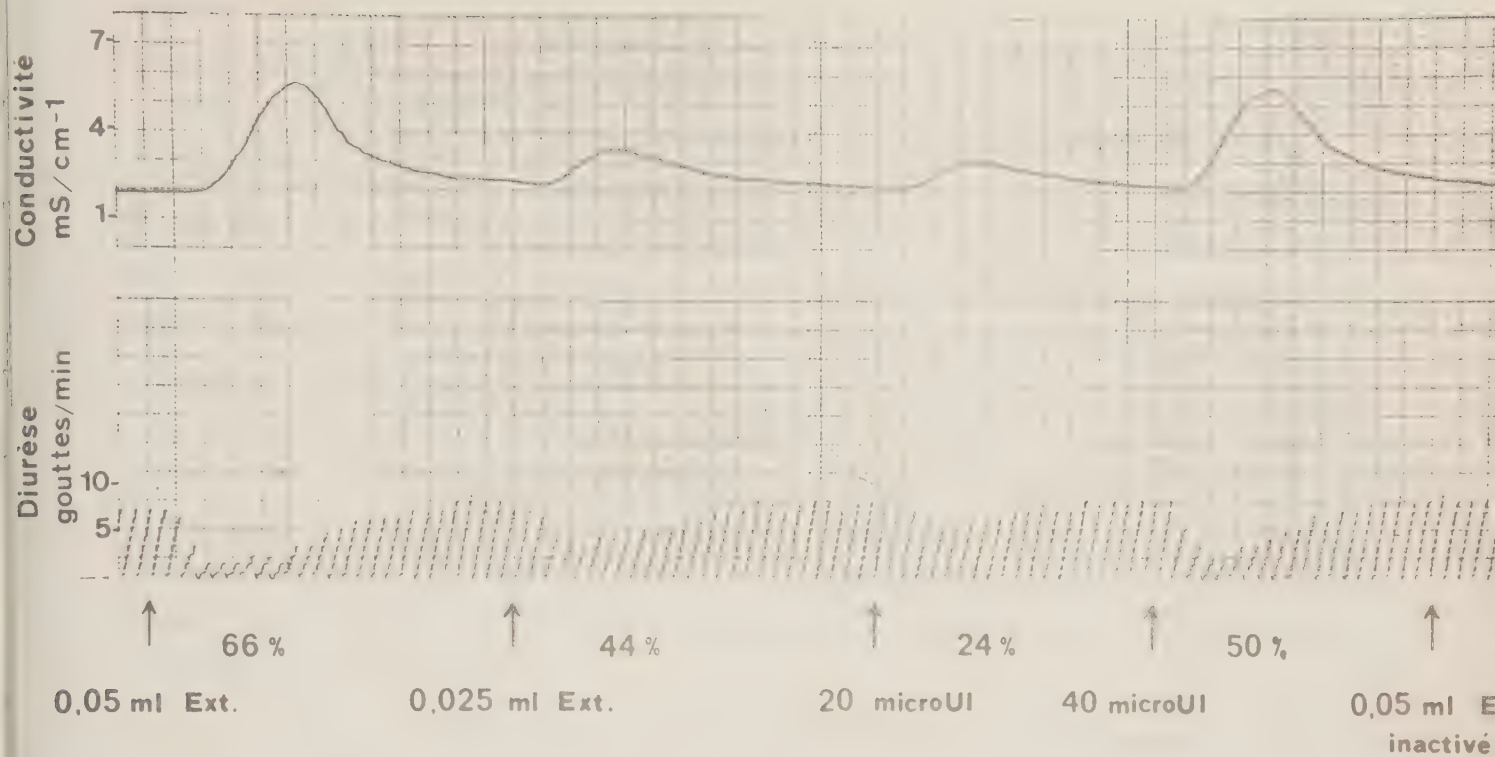


Figure 17 - Dosage sur antidiurèse et conductivité enregistrées simultanément.

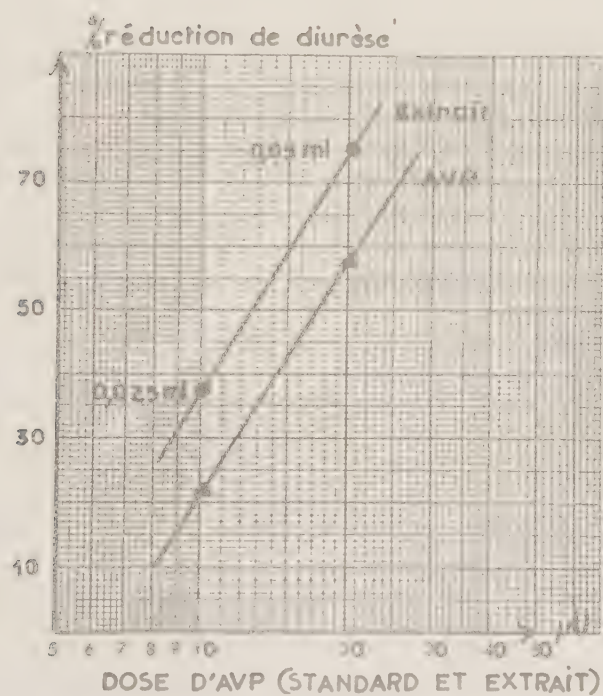


Figure 18 - Exemple de dosage sur l'antidiurèse. ("Essai à quatre points").

L'extrait risque de contenir des impuretés susceptibles de provoquer une antidiurèse non spécifique. Pour vérifier que l'effet observé est dû à l'hormone antidiurétique on peut étudier l'action de l'extrait au cours d'une diurèse de surcharge au mannitol : on ne doit observer aucune modification de la diurèse s'il s'agit uniquement de vasopressine. Cette méthode est insuffisante, la meilleure preuve est fournie par l'inactivation de l'hormone par le thioglycolate de sodium 0,1 M. Cette solution est préparée juste avant l'inactivation à partir de bicarbonate de sodium et d'acide thioglycolique. Le thioglycolate de sodium est ajouté à la solution standard et à l'extrait à doser de manière à avoir une concentration finale 0,01 M. Le mélange est incubé pendant 2 heures à la température ambiante puis injecté par voie intraveineuse.

Lorsque l'activité antidiurétique est due uniquement à l'AVP on n'observe plus d'effet sur la diurèse puisque l'hormone est inactivée de façon constante à 95% au moins (fig. 17). Lorsqu'une réponse antidiurétique subsiste, elle est soustraite de l'effet total.

En conclusion, pour pouvoir affirmer la présence de vasopressine dans les extraits, les critères suivants sont exigés (FADIAN, FORSLING, JONES et LEE, 1968) :

- les courbes de réponse de l'extrait et du standard doivent être parallèles,
- l'action de l'extrait et du standard sur la diurèse et sur la conductivité doit être identique du point de vue durée et survenue,
- l'abolition totale de ces actions par le thioglycolate de sodium 0,01 M,
- durant la diurèse de surcharge au mannitol, les extraits ne doivent pas modifier le flux urinaire,
- les extraits ne doivent pas modifier de façon importante la pression artérielle.

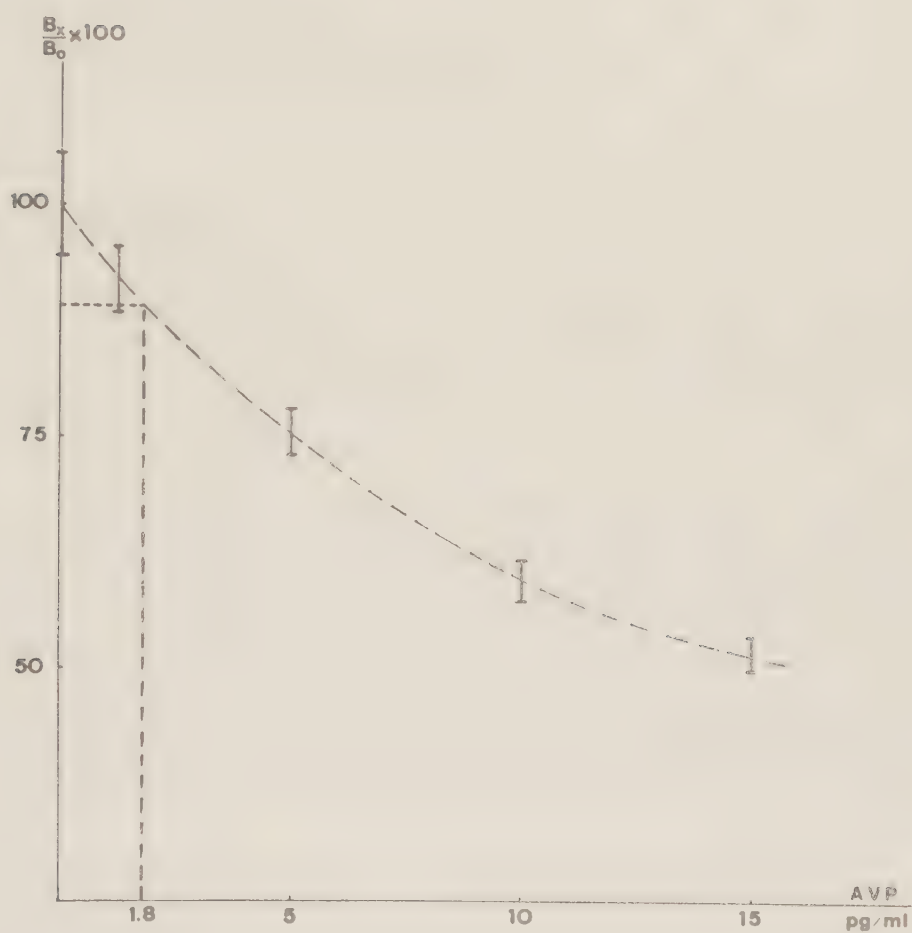


Figure 19 - Représentation schématique de la détermination expérimentale de la sensibilité du dosage de l'AVP pour l'immunsérum M dilué au 1/50.000° (Selon EKINS, 1969)

$\frac{B_x}{B_0}$: rapport entre la radioactivité liée aux anticorps en présence d'une quantité x d'AVP (B_x) et la radioactivité liée aux anticorps en l'absence d'AVP (B_0)

CHAPITRE VII

VALIDITÉ DU DOSAGE

A - SENSIBILITE DU DOSAGE -

Il existe différents modes d'expression de la sensibilité d'un radio-immuno-essai. Si l'on adopte celui d'EKINS (1969), la sensibilité est définie comme la plus faible quantité de substance à doser, détectable, que l'on peut distinguer du B_0 .

Pour assurer la meilleure sensibilité, l'antisérum doit être dilué de telle façon qu'il existe un excès d'antigène par rapport aux anticorps et que de très faibles quantités de substance froide puissent déplacer la radioactivité fixée sur ceux-ci.

Dans nos conditions expérimentales, à la dilution de 1/50.000° de l'immunsérum M, la sensibilité de notre dosage appréciée selon EKINS est de 1,8 pg/tube (fig. 19).

B - PRECISION DU DOSAGE OU REPRODUCTIBILITE "INTRA-ESSAI" -

La précision peut être définie par la dispersion des résultats obtenus pour un même échantillon, dosé à plusieurs reprises au cours de la même manipulation (MIDGLEY et coll., 1969). Cette définition s'applique aux différents points de la courbe de référence et aux valeurs d'AVP endogène trouvée dans les urines. L'expression de la dispersion peut être l'écart type représentant l'erreur pour chaque point. Cette dernière peut, elle-même, être exprimée en pourcentage par rapport à la valeur moyenne (coefficient de variation).

1/ Précision de la courbe de référence -

Sur une courbe de référence, la précision se situe entre 1,8 et 6,2 % par rapport à la valeur moyenne pour les points de la courbe situés entre 5 et 100 pg d'AVP/ml. Pour des concentrations supérieures à 100 pg/ml et inférieures à 5 pg/ml, l'écart type s'accroît davantage (entre 5 et 15%) (fig. 20). Ces constatations sont tout à fait classiques pour les dosages par compétition.

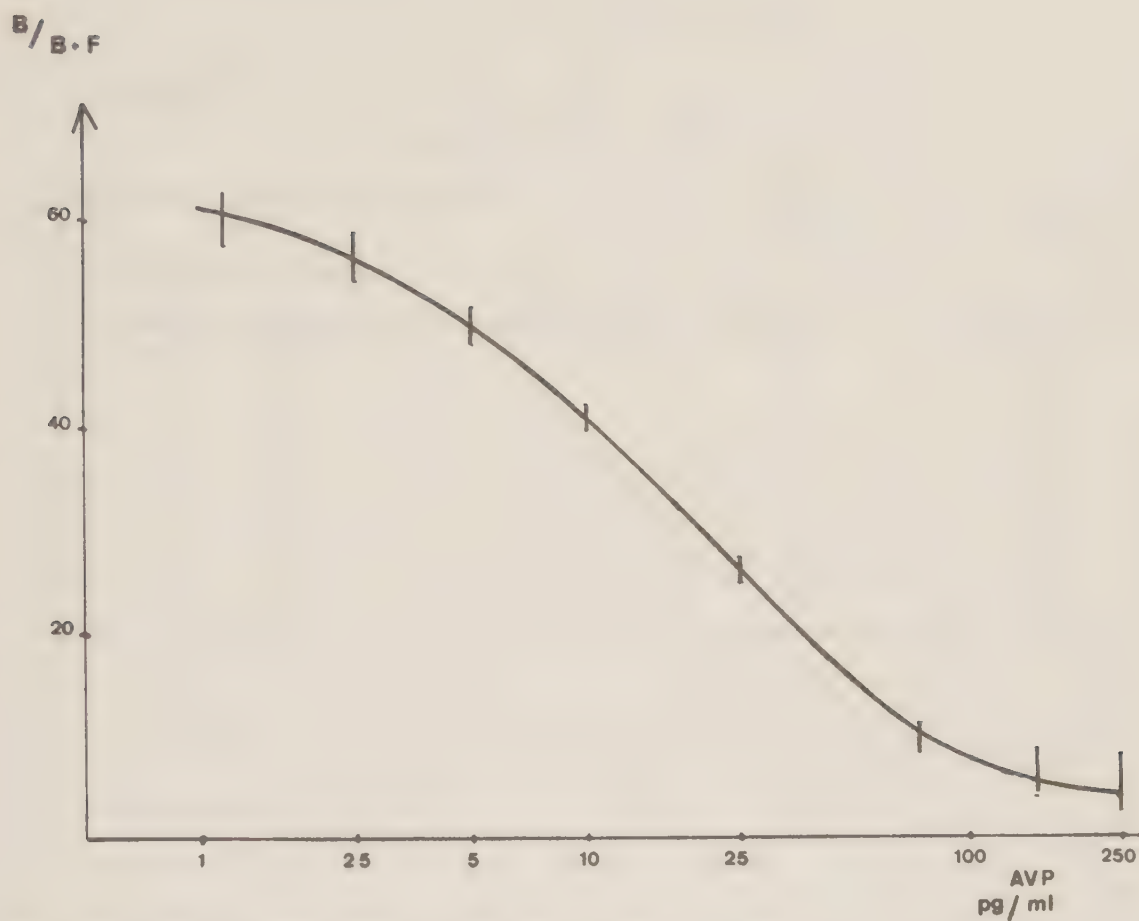


Figure 20 - Représentation schématique de la précision de la courbe de compétition pour l'immunsérum M dilué au 1/50.000°

TABLEAU VIII

Reproductibilité intra-essai de la détermination de l'AVP endogène urinaire
pour des concentrations différentes

Echantillon	Nombre d'Essais	Moyenne pg/ml d'urine	Ecart type pg/ml d'urine	Coefficient de variation %
1	9	11,83	0,86	7,3
2	4	43,65	2,07	4,7
3	10	145,90	10,09	6,9

2/ Précision de la mesure de l'AVP urinaire -

La précision des manipulations (exprimée par le pourcentage moyen de l'écart type par rapport à la valeur moyenne) étudiée sur des urines de trois sujets présentant des concentrations variables d'AVP endogène et dosées plusieurs fois lors de la même série de manipulations, est représentée sur le Tableau VIII. Cette précision est meilleure pour les concentrations moyennes d'AVP que pour les faibles et fortes concentrations.

C - REPRODUCTIBILITE "INTER-ESSAI" -

La reproductibilité peut être définie par la variation plus ou moins grande des résultats obtenus à partir d'une même urine, dosée à plusieurs reprises au cours de manipulations réalisées à plusieurs mois d'intervalle. Elle peut être également exprimée par le coefficient de variation.

Afin d'apprécier objectivement cette reproductibilité, une même urine a été dosée à plusieurs reprises sur une période de trois mois après l'avoir répartie en aliquots de 50 ml, décongelés uniquement au moment du dosage. La reproductibilité des résultats obtenus est de $45,31 \text{ pg/ml} \pm 3,14$ soit un coefficient de variation de 7,9 % (n = 40).

D - CORRELATION ENTRE LE DOSAGE BIOLOGIQUE ET LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE -

Pour s'assurer de la validité du dosage, nous avons dosé parallèlement par les méthodes biologique et radioimmunologique l'ADH dans des extraits urinaires. Ces extraits sont préparés dans les mêmes conditions aussi bien pour le dosage biologique que radioimmunologique, puis repris dans 2 ml de TRIS, EDTA pH 8,6 pour la méthode radioimmunologique et dans le même volume du même tampon, mais ajusté à pH 7,4 pour la technique biologique.

La droite de régression montre une corrélation très significative ($p < 0,001$, $r = 0,96$, $n = 16$) entre les deux séries de valeurs et ceci pour des taux d'excrétion urinaires compris entre 1,2 et 1700 mUI d'AVP/24 h. (fig. 21).

DISCUSSION -

Sur la courbe de référence, pour des concentrations comprises entre 5 et 100 pg d'AVP/ml on peut doser avec une précision satisfaisante (de 1,8 à 6,2%) l'AVP endogène urinaire. Au cours d'une même manipulation, la précision du dosage de l'AVP endogène urinaire est de l'ordre de 6%, alors

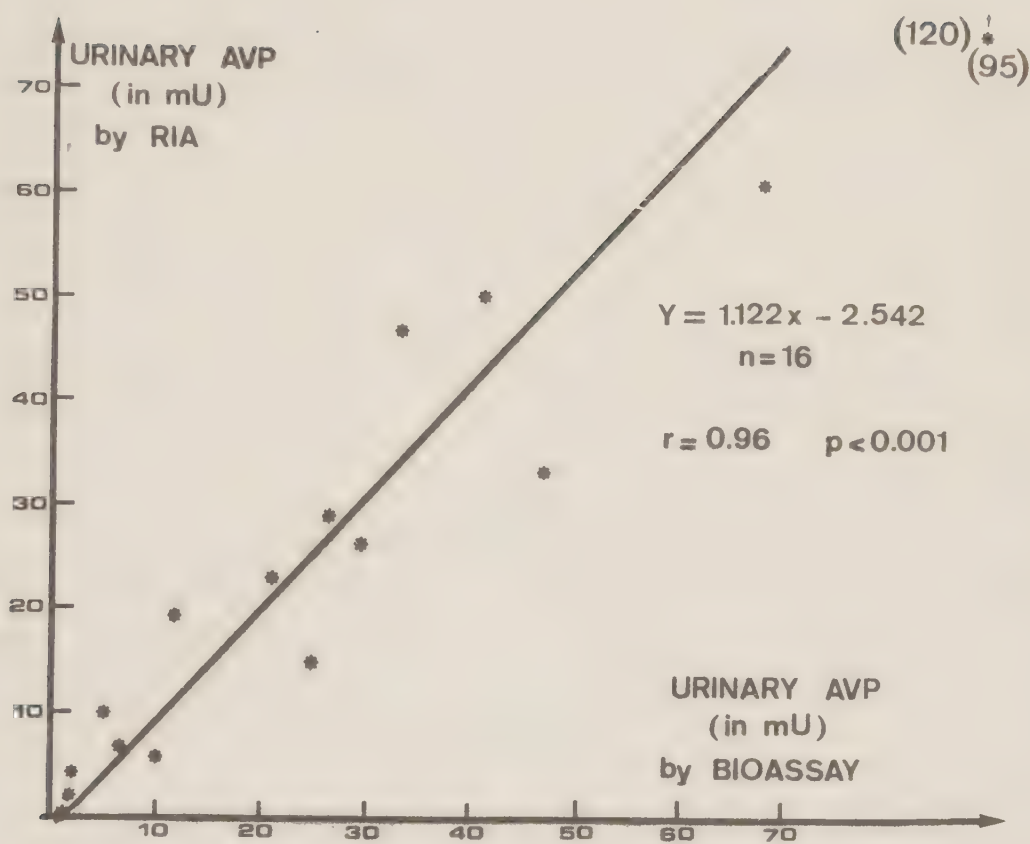


Figure 21 - Corrélation entre les concentrations urinaires d'AVP mesurées parallèlement par les méthodes radioimmunologique et biologique après extraction sur Amberlite.

qu'elle est de l'ordre de 8% quand les dosages sont réalisés sur la même urine lors de manipulations différentes.

La corrélation entre dosages biologique et radioimmunologique d'extraits urinaires, préparés dans les mêmes conditions, est très significative ($p < 0,001$) pour des taux d'excrétion compris entre 1,2 et 1700 mU/24 h, ce qui correspond aux taux physiologiques et pathologiques rencontrés d'une façon courante.

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATIONS

L'EXPRESSION DES RESULTATS : mUI ou pg ?...

Le problème de la standardisation de l'ADH n'est toujours pas résolu. Apparemment, le problème est simple puisque l'on disposait du 3ème standard des substances vasopressives, antidiurétiques et ocytociques (O.M.S. {1957}, National Biological Standards Boards ou N.B.S.B.) où chaque ampoule contient 2 UI vasopressives, ocytociques et antidiurétiques. Ce standard est actuellement épuisé et le N.B.S.B. propose maintenant comme standard la L.V.P. Par ailleurs l'AVP de synthèse, commercialisée par différents laboratoires, n'a pas du tout la même activité. C'est ainsi que :

- l'AVP de synthèse fournie par "*Ferring*" a un pouvoir presseur, chez le Rat, équivalent à 356 UI/mg (HAYWARD et coll., 1976);

- l'AVP de synthèse fournie par "*Medical College of Ohio*" a un pouvoir antidiurétique, chez le Rat, de 364 UI/mg (HAYWARD et coll., 1976);

- l'AVP de synthèse fournie par "*Sandoz*" a un pouvoir presseur, chez le Rat, de 470 UI/mg (BAUMANN et coll., 1976);

- la LVP de synthèse fournie par "*Sigma*" a un pouvoir presseur, chez le Rat, de 119 UI/mg (HAYWARD et coll., 1976).

Nous avons testé dans le Laboratoire, l'activité antidiurétique d'une solution d'AVP fournie par "*Ferring*" contre le 3ème standard international de 1957. L'activité trouvée est de 80,5 UI/ml $\pm$ 13,9, alors que l'activité garantie par *Ferring* est comprise entre 125,5 et 179,2 UI/ml (les indications pondérales ne sont jamais fournies).

Pour nos calculs, nous avons utilisé une valeur admise par tous les laboratoires (sans aucune justification) :

$$1 \mu\text{UI} = 2,5 \text{ pg d'AVP}$$

Si nous n'avons pas utilisé une équivalence propre, c'est que *Ferring* n'a jamais fourni de renseignement sur le poids de l'AVP contenue dans chaque ampoule.

CHAPITRE I

TAUX D'EXCRÉTION D'ADH URINAIRE PAR 24 HEURES

L'établissement des valeurs de référence doit être réalisé chez des individus sains en état d'équilibre hydrique. Le protocole expérimental adopté est le suivant :

Les sujets vident leur vessie à 7 h. du matin (au réveil) puis recueillent leurs urines jusqu'à 7 h. le lendemain. Les sujets sont normalement hydratés au cours de la période de recueil. Les urines sont conservées à 4°C. Au bout de 24 heures, le volume et l'osmolalité des urines recueillies sont mesurés, puis les urines sont acidifiées avec l'acide acétique à pH 4,5 et congelées à -20°C jusqu'au moment du dosage. Il faut noter qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une acidification des urines au fur et à mesure du recueil (cf Tableau III).

A - EXCRETION D'ADH URINAIRE PAR 24 Heures CHEZ L'ADULTE -

Le Tableau IX résume les valeurs obtenues chez 22 sujets sains (9 hommes et 13 femmes), âgés de 22 à 42 ans. Le taux moyen d'excrétion d'ADH urinaire est de 30,58 mUI/24 h. $\pm$ 11,64 soit 76,45 ng/24 h. $\pm$ 29,11 (cf Expression des résultats), les valeurs extrêmes étant de 14 et 56 mUI/24 h.

Si l'on considère séparément le taux d'excrétion d'ADH urinaire chez l'Homme et chez la femme, celui-ci est de 35,44 mUI/24 h $\pm$ 14,65 chez l'homme et de 27,20 mUI/24 h $\pm$ 8,01 chez la femme, sans différence significative entre les deux séries de valeurs.

Nous avons également noté une corrélation significative entre l'osmolalité et le taux d'excrétion d'ADH urinaire par 24 heures ($p < 0,005$; $n = 22$).

Le taux d'ADH urinaire a été également déterminé sur des urines de 24 h., d'étudiants tunisiens âgés de 19 à 22 ans, pendant la même période. Le taux moyen est de 49,55 mUI/24 h $\pm$ 16,13 ($n = 13$) (Tableau X).

TABLEAU IX

Excrétion urinaire d'ADH et de Neurophysines par 24 h., chez 22 sujets sains normalement hydratés

Hommes	Volume ml/24 h	U _{osm} mOsm/kg	ADH mU/24 h.	Neurophysines ng/24 h.
A.Z.	1430	856	42,5	ID*
C.G.	1510	442	14	
D.B.	750	840	42,5	3664
G.A.	1400	685	24,4	ID
R.F.	1290	712	15,5	2812
P.H.	1330	810	47	ID
D.B.	1050	892	33	2617
J.M.C.	620	1068	56	62
J.C.	1450	650	44,1	5511
Femmes				
C.B.	1088	547	28,2	
G.G.	996		30,4	
B.S.	1450	728	38,1	128
R.M.V.	1580	608	31,2	174
J.P.	1580	368	14,3	174
C.G.	660	1120	33,9	125
L.P.	1030	618	22,9	31
D.P.	1030	558	16,2	1751
S.Q.	820	896	39,2	2771
G.G.	800	844	24	176
Y.D.	620	1080	33	205
M.V.	1030	736	23,6	ID
E.J.	2120	295	18,7	1908

ID* = Indetectable

TABLEAU X

Excrétion urinaire d'ADH et de Neurophysines chez 13 sujets tunisiens
âgés de 19 à 22 ans, normalement hydratés

	Volume ml/24 h.	U _{osm} mOsm/kg	ADH mUI/24 h	Neurophysines ng/24 h
BOUG.	1185	1630	66,6	4858
ZEM.	1880	936	26,3	
BEL.	1720	1138	57,6	2580
CHAR.	1630	1154	20,	1956
SAA.	1820	1240	57,4	
BOUR.	1240	1466	38,6	1984
BENA.	1850	1018	58,8	1110
GAC.	1680	1230	50,5	2688
OUAZ.	980	1706	60,8	1960
NAC.	1640	1136	36,5	2460
KHAR.	1720	1218	38,5	1720
KAL.	1280	1312	58,9	1280
HAM.	1410	1206	73,6	1128

TABLEAU XI

Taux d'ADH urinaire trouvés par méthode radioimmunologique
chez le sujet normal (LEGROS, 1976)

Conditions de prélèvement	Valeurs	Auteurs
Hydratation normale	11 - 91,4 mUI/24 h	MILLER et MOSES, 1972
17 femmes 17 hommes normalement hydratés	34 ng/24 h 70 ng/24 h	MERKELBACH et coll. 1975
7 hommes (une nuit de restriction)	$4,4 \pm 3,2$ ng/h	ALHENC-GELAS et coll. 1974
6 hommes normalement hydratés	0,53 - 24 ng/h	LEGROS et coll., 1973
45 sujets normalement hydratés	$67,5 \pm 34,5$ ng/24 h (21 - 142)	FREISENHAUSEN et coll. 1976

DISCUSSION -

Le taux moyen d'excrétion urinaire chez 22 sujets sains, normalement hydratés, est de $30,58 \text{ mUI/24 h.} \pm 11,64$ soit $76,45 \text{ ng} \pm 29,11$. Ces résultats sont en bon accord avec ceux mentionnés dans la littérature (Tableau XI).

MILLER et MOSES (1972) indiquent des taux de l'ordre de $28,9 \text{ mUI/24 h.}$; les valeurs extrêmes étant de 11 et $91,4 \text{ mUI/24 h.}$ (70% des valeurs se situent au-dessous de 30 mUI/24 h.).

MERKELBACH et coll. (1975) ont trouvé une excrétion urinaire d'ADH à 70 ng/24 h. chez l'homme et 34 ng/24 h. chez la femme. Cette différence significative n'a pas été trouvée dans nos résultats. FREISENHAUSEN et coll. (1976) ont évalué cette excrétion à $67,5 \pm 34,5 \text{ ng/24 h.}$ (les valeurs extrêmes sont comprises entre 21 et 142 ng). Ce taux a été trouvé plus élevé chez des étudiants tunisiens âgés de 19 à 22 ans. Il serait intéressant de déterminer cette excrétion urinaire d'ADH chez des adultes français, de la même tranche d'âge et pendant la même période, pour étudier le rôle des conditions climatiques dans l'excrétion d'ADH urinaire.

B - EXCRETION D'ADH URINAIRE PAR 24 heures chez l'ENFANT -

Le Tableau XII résume les valeurs obtenues chez 34 enfants sains, normalement hydratés, âgés de 2 à 13 ans. Le taux moyen d'excrétion d'ADH urinaire est de $17,91 \text{ mUI/24 h} \pm 10,36$; les valeurs extrêmes étant de 4,8 et $47,9 \text{ mUI/24 h.}$

Nous avons trouvé une corrélation très faiblement significative entre le taux d'ADH urinaire et l'âge chronologique des enfants ($p < 0,1$) de même qu'avec l'élimination urinaire de créatinine endogène par kg de poids corporel ($p < 0,1$). Une séparation arbitraire en deux tranches d'âge, allant de 2 à 5 ans et de 5 à 13 ans, montre que les taux sont différents entre ces deux tranches.

Pour la première tranche d'âge (2 à 5 ans), le taux moyen d'excrétion d'ADH est de $12,73 \text{ mUI/24 h} \pm 6,09$ ($n = 12$) avec une corrélation significative entre osmolalité et taux d'ADH urinaire ($p < 0,01$).

Pour la deuxième tranche d'âge (5 à 13 ans) le taux moyen d'excrétion d'ADH est de $20,73 \text{ mUI/24} \pm 11,14$ ($n = 22$) avec absence de corrélation entre osmolalité et taux d'ADH urinaire ($p < 0,1$).

TABLEAU XII

Excrétion urinaire d'ADH et de neurophysines par 24 h. chez 34 enfants normalement hydratés

Age (ans)	Volume ml/24 h	U _{osm} mOsm/kg	ADH mUI/24 h.	Neurophysines ng/24 h.
ALL. 2	500	621	11,5	500
GEX. 2 1/2	390	690	12	3218
LAS. 3	520		12	
BUR. E 3 1/2	400	826	10,2	92
GHA. P 3 1/2	280	1089	20	196
D.B. 4	725	630	6,8	3371
A.C. 4	370	982	22,3	229
DAL.A. 4	690	831	13,5	ID *
MAR. 4	650	720	4,8	ID
CHA.S. 4 1/2	420	1154	9,3	
MIL. 4 1/2	570	534	7	542
CHAR. 5	205	1184	23,3	5740
BOUL. 5	210	1128	36,3	126
BIR. L 5 1/2	500	898	31,8	250
BES. 6	420	999	5,5	378
BUR.S. 6	530	739	10,3	ID
BIR. B 6 1/2	555	944	34,2	283
COL. 6 1/2	560	770	12,1	5768
DAL.S. 7	570	781	30,9	ID
DO. E. 7	380	1092	22	236
MOI.G. 7	580	878	12,6	ID
GEX.C. 7 1/2	495	854	4,2	5047
GHA.C. 7 1/2	470	1106	47,9	508
BUR.C. 8	370	938	9,7	185
BIR.H. 8 1/2	705	931	31,3	268
DO. F. 8 1/2	480	458	22,2	33
TISH. 8 1/2	645	986	12	626
A. N. 9	730	1058	18,3	496
CHA.E. 9	760	718	16,2	152
POM. 9 1/2	570	890	16,9	57
SER. 10	710	781	25,3	1278
BLA. 11 1/2	540	646	15,5	ID
BER. 12	575	934	23,6	196
TRAM. 13	650	963	28,4	3770

ID* = indetectable

DISCUSSION -

Le taux moyen d'ADH urinaire, chez l'enfant, a été trouvé à $17,99 \text{ mUI/24 h} \pm 10,36$. Ces taux sont inférieurs à ceux trouvés chez l'adulte ($30,58 \pm 11,64$). La différence entre les deux séries de valeurs est très significative ($p < 0,001$).

La séparation arbitraire en deux tranches d'âge (2 à 5 ans et 5 à 13 ans) montre que ce taux est de $12,73 \text{ mUI/24 h} \pm 6,09$ pour la première et de $20,73 \text{ mUI/24 h} \pm 11,14$ pour la seconde avec existence d'une différence très significative entre les deux séries de valeurs ($p < 0,001$).

Cette étude devrait être poursuivie pour voir quelle est la part de l'ADH dans le métabolisme hydrique, très particulier, qui existe chez les très jeunes enfants (renouvellement très rapide du capital hydrique) sans oublier que l'immaturité rénale a certainement un rôle.

Nous avons également noté l'existence d'une corrélation significative entre l'osmolalité et le taux d'excrétion d'ADH urinaire uniquement pour la première tranche d'âge ($p < 0,01$).

D'après ces résultats préliminaires, il ne semble pas exister de corrélation avec l'âge chronologique, l'élimination urinaire de créatinine endogène par kg de poids corporel ou avec la surface corporelle.

CHAPITRE II

EFFETS DE LA CHARGE ET DE LA RESTRICTION HYDRIQUE

A - PROTOCOLE EXPERIMENTAL -

Six sujets normaux ont été soumis à l'épreuve de charge hydrique selon le protocole suivant :

les sujets sont à jeun; après avoir vidé leur vessie, ils absorbent 300 ml de liquide entre 7 h et 7 h30.

On pratique un premier recueil urinaire (U₀) entre 7 h30 et 8 h30; puis en 20 minutes ils absorbent 20 ml d'eau par kg de poids corporel.

Les urines sont ensuite recueillies toutes les heures jusqu'à 12 h30 (prélèvements U₁, U₂, U₃ et U₄).

Sept sujets normaux ont été également soumis à l'épreuve de restriction de boisson selon le protocole suivant :

L'épreuve est réalisée de 20 h. à 12 h le lendemain. Les urines sont recueillies de la 12^{ème} à la 16^{ème} heure de restriction (entre 9 h et 12 h le lendemain). On recueille également les urines de 18 h à 20 h., les deux heures précédant le début de la cure de soif.

Le volume et l'osmolalité de chaque échantillon mesurés, on acidifie à pH 4,5, avant congélation, les prélèvements suivants :

- les échantillons U₀ et U₂ qui correspondent aux urines de l'heure qui précède la surcharge hydrique (U₀) et de la 2^{ème} heure de celle-ci (U₂),

- les échantillons qui correspondent aux urines qui précèdent la restriction de boisson et de la fin de celle-ci.

Par contre, la clairance de l'eau libre n'a pas été mesurée.

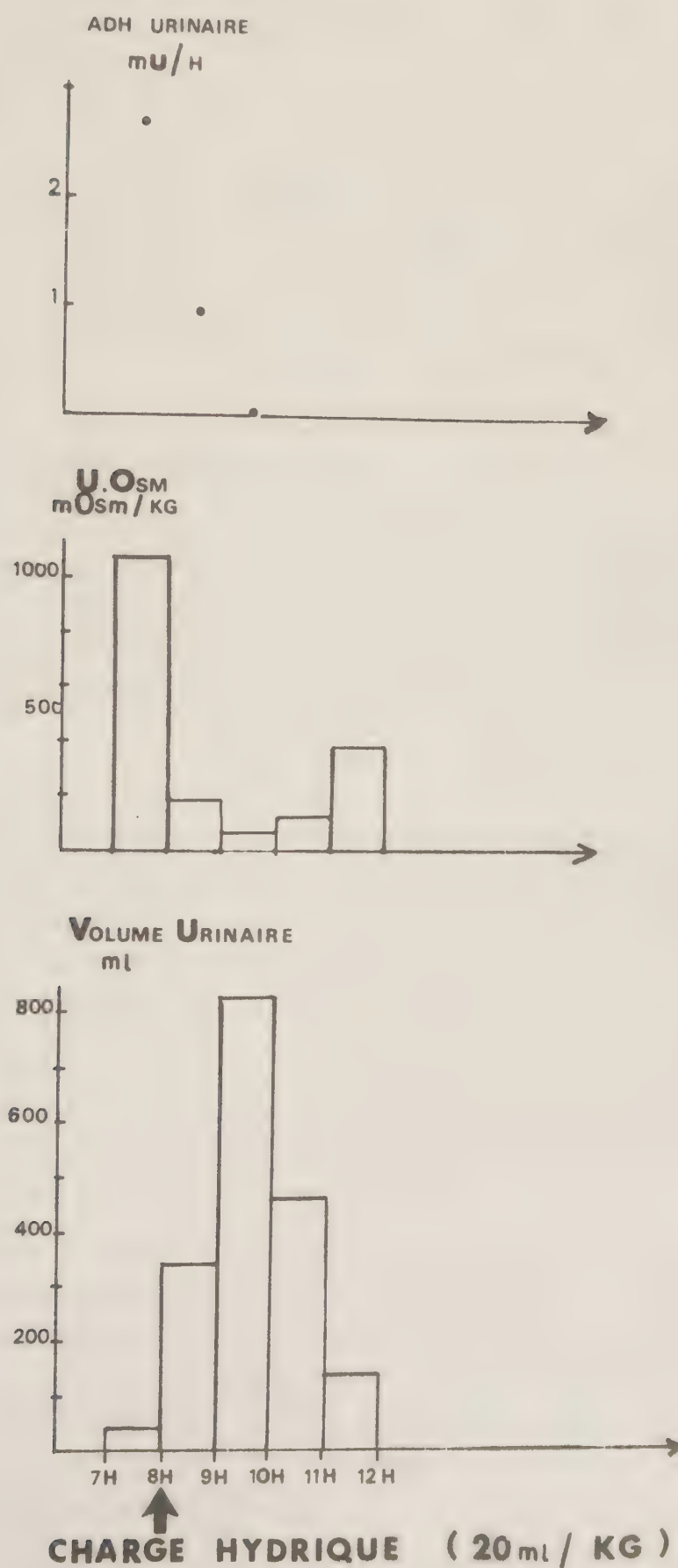
TABLEAU XIII

Evolution du débit horaire urinaire, des osmolalités et des taux d'ADH urinaires avant (U_0) et pendant la charge hydrique ($U_1 \rightarrow U_4$)

		U_0	U_1	U_2	U_3	U_4
G.A.	ml/h	130	554	710	100	60
	mOsm/kg	427	105	100	545	660
	ADH mUI/h	0,42		ID*		
C.B.	ml/h	92	160	980	620	55
	mOsm/kg	509	328	59	61	515
	ADH mUI/h	1,78	0,96	ID		
A.Z.	ml/h	26	115	845	185	63
	mOsm/kg	998	343	55	183	600
	ADH mUI/h			ID		
C.G.	ml/h		380	660	460	90
	mOsm/kg	411	136	95	94	475
	ADH mUI/h			ID		
B.M.	ml/h	67	360	550	370	60
	mOsm/kg	482	118	84	103	434
	ADH mUI/h	0,74		ID		
D.B.	ml/h	42	340	830	460	135
	mOsm/kg	1086	187	69	103	392
	ADH mUI/h	2,71		ID		

ID* : indétectable

Figure 22 - Evolution, chez un même sujet, du débit horaire, de l'osmolalité et du taux d'ADH urinaires au cours de l'épreuve de charge hydrique (20 ml/kg)



B - RESULTATS DE LA CHARGE HYDRIQUE -

Le Tableau XIII résume les débits urinaires horaires, les osmolalités et les taux d'ADH trouvés avant et à la 2ème heure de surcharge hydrique à raison de 20 ml par kg de poids corporel. Il est intéressant de noter qu'au cours de la 2ème heure de surcharge, et pour les six sujets soumis à cette épreuve, aucune activité antidiurétique n'est plus décelable dans les urines au moment où la diurèse est maximum (entre 550 et 980 ml/heure) et l'osmolalité urinaire est la plus faible (entre 55 et 100 mOsm/kg).

La figure 21 montre, pour un même sujet, l'évolution du débit horaire, l'osmolalité et le taux d'ADH urinaires au cours de l'épreuve de surcharge hydrique.

C - RESULTATS DE LA RESTRICTION DE BOISSON -

Les valeurs de l'osmolalité et des taux d'ADH urinaires, avant et après restriction de boisson, sont rapportés dans le Tableau XIV. On constate que les taux d'ADH s'élèvent chez 5 sujets sur 7, bien que les osmolalités urinaires soient peu modifiées entre la période témoin (urine de 18 h à 20 h. précédant la restriction) et la fin de la restriction.

DISCUSSION -

Dans notre protocole, l'épreuve de restriction de boisson n'a pas eu l'effet attendu comme on peut le constater aussi bien sur le taux d'ADH que sur les osmolalités urinaires. En effet, la période témoin choisie n'est certainement pas la meilleure car les sujets sont déjà en restriction relative comme en témoignent les valeurs de l'osmolalité.

Cependant, des taux d'ADH du même ordre ont été rapportés par MILLER et MOSES (1972) après une restriction de 14 heures. Par contre, des taux nettement plus élevés ont été trouvés par MERKELBACH et coll. (1975) après une restriction de 11 heures (de 7 h à 18 h.)

Pour la charge hydrique, où les résultats sont appréciés chaque heure pendant une période de 5 heures, ces résultats sont plus convaincants puisque l'ADH est indétectable dans les urines des 6 sujets soumis à cette épreuve au moment où la diurèse est maximum. Des résultats comparables ont été rapportés par MILLER et MOSES (1972), FRESSINAUD et coll. (1974) mais sans annulation du taux d'ADH à la 2ème heure et ceci pour une charge hydrique de 15 ml/kg de poids corporel.

TABLEAU XIV

Osmolalités et taux d'ADH urinaires avant et après 16 h. de restriction hydrique

	1 heure avant le début de la restriction		Dernière heure d'une restriction de 16 heures	
	Osmolalité urinaire mOsm/kg	Taux d'ADH urinaire : mUI/h	Osmolalité urinaire mOsm/kg	Taux d'ADH urinaire mUI/h
G.A.	256	0,62	908	0,90
G.G.	820	1,18	886	2,57
C.B.	813	1,43	825	3,84
A.Z.	976	1,80	976	2,53
C.G.	1060	1,52	1080	1,26
B.M.	930	2,79	1004	2,60
D.B.	1180	1,33	1182	2,05

CHAPITRE III

CORRELATION ENTRE OSMOLALITÉ ET EXCRÉTION D'ADH URINAIRES

Nous avons trouvé une corrélation très significative entre l'osmolalité et l'excrétion d'ADH urinaires en ne considérant que les valeurs trouvées au cours des épreuves de restriction et de surcharge hydrique et dans les échantillons urinaires recueillis sur une période d'une heure, chez des sujets normalement hydratés. Nous avons, toutefois, éliminé les valeurs trouvées pour les urines de 24 heures. Il semble, en effet, peu logique d'établir, entre le taux d'ADH et l'osmolalité urinaire, une corrélation sur des périodes aussi longues. Pourtant, celle-ci est assez significative pour les adultes et les enfants âgés de 2 à 5 ans.

L'équation de la droite de régression est :

$$U_{\text{osm}} = 266 \times U_{\text{AVP}} + 276 \quad (p < 0,001 ; r = 0,74, n = 36) \text{ (fig. 22)}$$

DISCUSSION -

Il existe une corrélation hautement significative entre l'osmolalité et le taux d'ADH urinaire ($p < 0,001$). Des résultats comparables ont été trouvés par MERKELBACH et coll. (1975) en étudiant la corrélation entre la clairance de l'eau libre et le taux d'ADH urinaire au cours de l'épreuve de surcharge hydrique ($p < 0,001$).

Compte tenu de cette corrélation, on peut difficilement fixer le seuil d'apparition de l'ADH dans les urines à partir d'une osmolalité urinaire de 276 mOsm/kg, puisque l'on sait que l'ADH retrouvée dans les urines représente, au maximum, 27% de la quantité sécrétée (BAUMANN et DINGMAN, 1976).

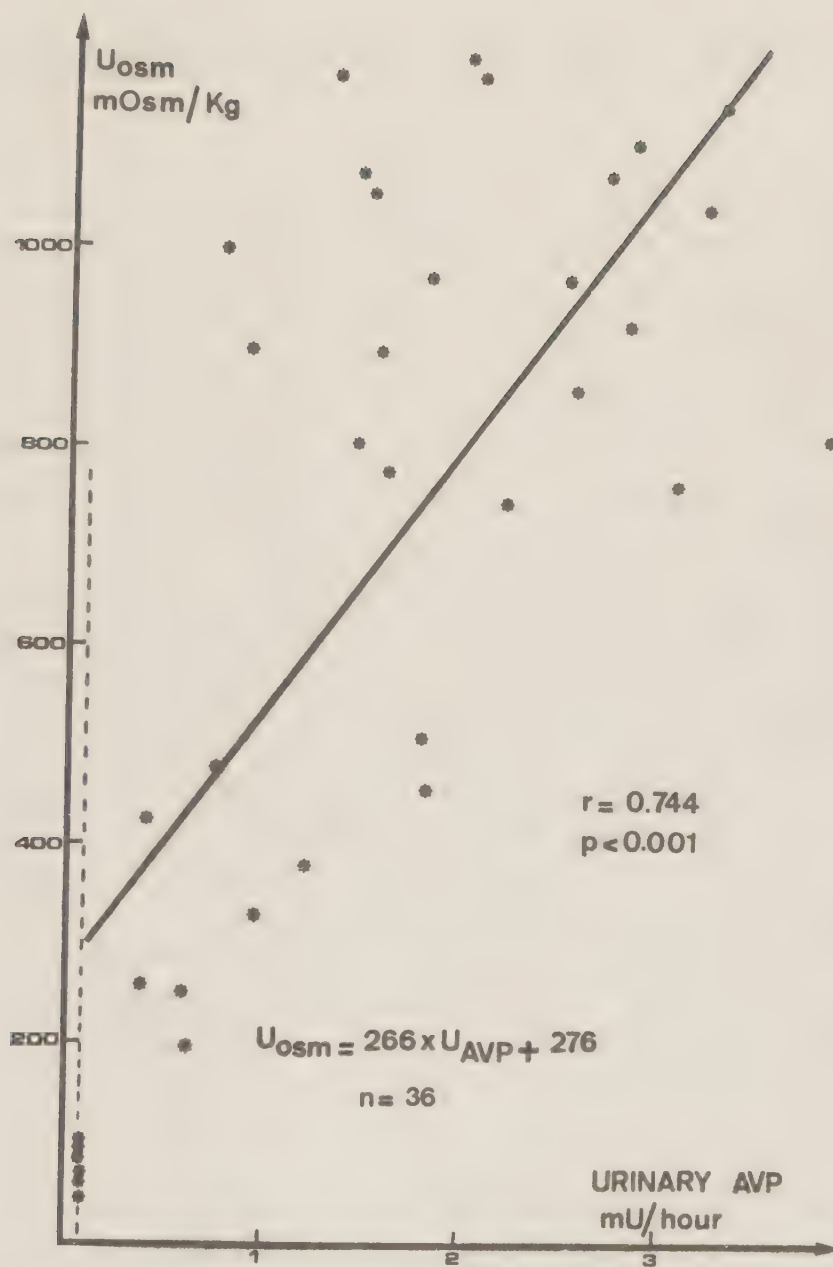


Figure 23 - Corrélation entre l'excrétion urinaire d'AVP et l'osmolalité urinaire.

CHAPITRE IV

CORRÉLATION ENTRE EXCRÉTION D'ADH ET DE NEUROPHYSINES DANS LES URINES

Il existe deux neurophysines principales de composition physico-chimique très voisine, se différenciant par leur migration électrophorétique. "*In vitro*", les neurophysines fixent indifféremment l'ocytocine et l'hormone antidiurétique (GINSBURG et THOMAS, 1969; COHEN et coll., 1973). "*In vivo*", il est bien établi que chaque neurophysine est spécifiquement associée à une hormone et qu'il est possible de stimuler la libération d'une seule neurophysine sans libération de l'autre. C'est ainsi que l'on a pu démontrer l'élévation spécifique de la neurophysine I dans le sang (supposée liée au niveau hypothalamo-post-hypophysaire à l'ocytocine) au cours de la parturition chez la Vache (ROBINSON et coll., 1971) et lors de la tétée (LEGROS et coll., 1974) et l'élévation spécifique de la neurophysine II dans le sang (supposée liée au niveau hypothalamo-post-hypophysaire à l'hormone antidiurétique) lors de l'hémorragie chez la Vache (LEGROS et coll., 1975) et chez le Porc (JOHNSTON et coll., 1975) avec corrélation significative entre les taux de neurophysine II et de l'hormone antidiurétique dans le plasma.

Nous avons cherché à établir une corrélation entre l'excrétion d'ADH et de neurophysines dans les urines de 24 heures. Aucune corrélation ne semble exister ni pour les enfants ni pour les adultes ($p < 0,5$).

DISCUSSION -

Contrairement à la corrélation établie entre la libération de neurophysine et d'ADH dans le plasma, il ne semble pas exister de corrélation dans l'excrétion de ces deux substances dans les urines ($p < 0,5$). Par contre, une notion intéressante mérite d'être vérifiée. En effet, comme le montre le Tableau XII, l'excrétion urinaire de neurophysines semble revêtir un caractère familial : c'est le cas des enfants DAL. dont le taux de neurophysines urinaires est indétectable, alors que les enfants GEX. présentent des taux très élevés. Une étude plus poussée est en cours pour la vérification de cette notion.

CONCLUSIONS GENERALES

Le travail a porté essentiellement sur la mise au point d'un système radioimmunologique de dosage de l'hormone antidiurétique (ADH) dans les urines et sur ses applications physiologiques et pathologiques.

1°/ Le dosage radioimmunologique remplace ainsi le dosage biologique de l'hormone antidiurétique dans les urines; ce dosage biologique, pratiqué depuis une dizaine d'années dans le laboratoire, a rendu des services incontestables surtout pour le dépistage des hypersécrétions inappropriées d'ADH. Mais sa réalisation est complexe, son interprétation est difficile et son prix de revient est très élevé.

2°/ Cette nouvelle technique n'a été possible qu'après obtention d'anticorps spécifiques de l'arginine vasopressine et préparation d'une hormone marquée répondant aux critères exigés pour un dosage radioimmunologique. L'hormone marquée est la Lysine Vasopressine (stabilité plus grande). Bien que la LVP iodée (^{125}I) ait perdu la plus grande partie de son activité biologique, la molécule conserve toutes ses propriétés immunologiques; elle a un comportement identique à celui de la LVP de synthèse non iodée vis à vis des anticorps anti-LVP.

En possession d'anticorps spécifiques antivasopressine et d'hormone marquée immunologiquement compétente, nous avons alors défini les conditions de l'essai radioimmunologique de l'ADH dans les urines.

D'utilisation relativement facile, cette technique permet de doser simultanément une vingtaine d'échantillons.

3°/ Grâce à cette technique sensible, spécifique et reproductible il est donc possible d'apprécier les taux d'excrétion urinaire d'ADH à partir d'un volume de 20 ml d'urine après extraction préalable sur Amberlite CG 50. Ce processus d'extraction présente le double but de concentrer l'hormone et de supprimer les interférences non spécifiques. Le rendement d'extraction de l'hormone est d'environ $92\% \pm 8$.

4°/ Pour s'assurer de la validité du dosage, nous avons dosé parallèlement, par la méthode biologique et radioimmunologique, l'ADH dans des extraits urinaires.

Nous avons trouvé une corrélation très significative ($p < 0,001$) entre les deux séries de valeurs pour des taux d'excrétion urinaire compris entre 1,2 et 1700 mU d'AVP pour 24 h.

5°/ Le taux d'excrétion urinaire d'ADH, chez l'adulte normal, est de 30,58 mUI/24 h. $\pm$ 11,64 soit 75,45 ng/24 h $\pm$ 29,11 et il n'y a pas de différence significative entre l'homme et la femme.

Par contre, chez l'enfant, âgé de 2 à 13 ans, le taux n'est que de 17,99 mUI/24 h. $\pm$ 10,36 sans que l'on ait pu démontrer une corrélation avec l'âge, l'élimination urinaire de créatinine endogène ou la surface corporelle; cette même absence de corrélation a été retrouvée pour l'élimination urinaire des neurophysines.

6°/ Au cours de l'épreuve de surcharge hydrique, à raison de 20 ml/kg de poids corporel, aucune activité antidiurétique n'est décelable dans les urines au moment où la diurèse est maximum. Par contre, les résultats de la restriction de boisson sont moins convaincants et ceci est vraisemblablement lié au mauvais choix de la période (pendant la nuit) au cours de laquelle les sujets sont en restriction relative. D'autre part il est possible (mais il faudrait le vérifier) que lors du prélèvement des urines, les facteurs de stimulation de la sécrétion d'ADH (augmentation de l'osmolarité des liquides extra-cellulaires, diminution de la sollicitation des récepteurs thoraciques par réduction de la volémie ou du fait du clinostatisme) n'étaient pas encore intervenus.

7°/ Nous avons également noté une corrélation très significative entre l'osmolalité urinaire et le taux urinaire d'ADH ($p < 0,001$), ceci sur une gamme d'osmolalité s'étalant de 55 à 1182 mOsm/kg.

Par contre, aucune corrélation ne semble exister entre les taux d'excrétion urinaires d'ADH et de neurophysines.

8°/ Ainsi, nous considérons que la mise au point, en routine, d'un système radioimmunologique de dosage de la vasopressine urinaire pourrait faciliter l'exploration des dysfonctionnements de la sécrétion de l'hormone antidiurétique et que la détermination du taux d'ADH, dans les urines de 24 h., présente un intérêt certain dans le dépistage des hypersécrétions inappropriées d'hormone antidiurétique. Ce dosage peut aussi être appliqué aux urines de malades en restriction de boissons lors de l'exploration d'un syndrome polyuro-polydipsique.

Le Président de la Thèse


J.F. CIER

Vu le Directeur de l'Unité Alexis CARREL

Vu et permis d'imprimer
LYON, le
Le Président de l'Université
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales

BIBLIOGRAPHIE

- ALHENC-GELAS F., FRESSINAUD P., CORVOL P., MENARD J. -
Etude de l'excretion urinaire de l'hormone antidiurétique chez l'Homme normal. Recherche des seuils natrémique et osmolaire de libération de l'ADH.
J. Urol. Néphrol., 1974, 12, 955
- ALLEVARD AM., GEELLEN G., ZEBIDI A., GHARIB C. -
Dosage radioimmunologique de l'hormone antidiurétique dans les urines chez l'Homme. Effet d'une charge hydrique et d'une deshydratation.
INSERM, Colloque de Synthèse, 1976, *Neuroendocrinologie*, rapport n° 7, 97.
- ANDREOLI T.E., GRANTHAM J.J., RECTOR F.C. -
In "*Disturbances in body fluid osmolarity*"
American Physiological Society, Bethesda 1977, 349 p.
- BAUMANN G., DINGMAN J.F. -
Distribution, blood transport and degradation of antidiuretic hormone in man.
J. Clin. Invest., 1976, 57, 1109
- BERDE B., BOISSONNAS R.A. -
Basic pharmacological properties of synthetic analogues and homologues of the neurohypophyseal hormones.
In "*Handbook of Experimental Pharmacologie*" B. BERDE Ed., SPRINGER VERLAG, Berlin 1968, vol. 23, 802
- BERSON S.A., YALOW R.S. -
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J. Clin. Invest., 1959, 38, 1996
- BERSON S.A., YALOW R.S. -
Immunoassay of protein hormones.
IN "*The hormones*" Pincus, Thiman and Aswood Ed., Academic Press, Inc. New York 1964, vol. IV, p. 557
- BOCKAERT J. -
Les récepteurs moléculaires de l'hormone antidiurétique et leurs relations fonctionnelles avec l'adényl-cyclase membranaire.
Thèse Doctorat d'Etat, Sciences, Paris 1973
- BOYD G.W., LANDON J., PEART W.S. -
Radioimmunoassay for determining plasma level of angiotensin II in Man.
Lancet, 1967, ii, 1002
- BOYD G.W., ADAMSON A.R., FITZ A.E., PEART W.S. -
Radioimmunoassay determination of plasma renin activity.
Lancet, 1969, i, 213
- BOYD N.H.R., JACKSON D.B., HOLLINGSWORTH S., FORSLING M.L. -
The development of a radioimmunoassay for oxytocin : the extraction of oxytocin from urine and determination of the excretion rate for exogenous and endogenous oxytocin in human urine.

COHEN P., GRIFFIN J., CAIZERGUES M., FROMAGEOT P. -

80/

Hormonal interactions at the molecular level : a high resolution proton magnetic resonance study of bovine neurophysins and their interactions with oxytocin.

F.E.B.S. Letter, 1972, 25, 282

CZERNICHOW P., REINHARZ A., VALLOTTON M.B. -

Immunochemical analysis of Rabbit antibodies against vasopressin.

Immunochemistry, 1974, 11, 47

DE WIED D. -

Supraoptic neurohypophyseal peptides on memory processes in rats.

INSERM, Colloque de Synthèse, 1976, *Neuroendocrinologie*, rapport n° 7, 77

EKINS R.P. -

Problems of sensitivity with special reference to optimal conditions.

In "*Protein and Polypeptide Hormones*" M. MARGOULIES Ed., Excerpta Medica, Amsterdam, 1969, 672

EPSTEIN A.N., KISSILEFF H.R., STELLAR E. -

The neuropsychology of thirst.

V.H. WINSTON and SONS Ed., Washington 1973.

FABIAN M., FORSLING M.L., JONES J.J., LEE, J. -

The antidiuretic material detected in human body fluids and tumor tissue.

J. Physiol. (London), 1968, 195, 61

FERGUSON D.R., HELLER H. -

Distribution of neurohypophyseal hormones in mammals.

J. Physiol. (London), 1965, 180, 846

FREISENHAUSEN H.D., FRAHN H., CABRIJAN T. -

The development of a radioimmunoassay for arginine-vasopressin.

Acta Endocrinol., 1976, 83, 50

FRESSINAUD P., CORVOL P., MENARD J. -

Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone in man: stimulation-suppression tests.

Kidney Intern., 1974, 6, 184

GEELLEN G., ZEBIDI A., ALLEVARO A.M., SEMPORE B., GHARIB C. -

Positive correlation between urinary vasopressin measured by radioimmunoassay and urine osmolality in man.

XXVIIème Congrès International des Sciences Physiologiques, Paris 1977.

GEORGE C.P.L., MESSERLI F.H., GENEST J., BOUCHER R., KUCHEL O. -

Diurnal variation of plasma vasopressin in man.

J. Clin. Endocr. Metab., 1975, 41, 332

GHARIB C. -

Le dosage de l'hormone antidiurétique.

Rev. fr. Et. Clin. Biol., 1967, 12, 398

GHARIB C. -

L'hormone antidiurétique. Physiologie. Dosage biologique. Applications cliniques du dosage.

Thèse de Médecine, LYON 1968

GHARIB C., BERTHELON A., SASSARD J., DUTRUGE J. -

Le dosage biologique de l'hormone antidiurétique.

87ème Congrès Association française pour l'avancement des Sciences.

Nancy 1968, THOMAS Ed., 41

- GILLILAND P.F., PROUT T.E. -
Immunologic studies of octapeptides.
Metabolism, 1965, 14, 912
- GINSBURG M., THOMAS P.J. -
The molecular dimensions of porcine neurophysin and some thermodynamic parameters of the reaction with lysine vasopressin.
J. Physiol. (London), 1969, 201, 181
- GLICK S.M., KUMARESAN P.K., KAGAN A., WHEELER M. -
Radioimmunoassay of oxytocin.
In *"Protein and Polypeptide Hormones"* M. MARGOULIES Ed., Excerpta Medica Amsterdam 1969, 81
- GOODFRIEND T., LEVINE L., FASMAN G.D. -
Antibodies of bradykinine and angiotensin and use of carbodiimide in immunology.
Science (N.Y.), 1964, 144, 1344
- GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLOVER J. -
Preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. J., 1963, 89, 114
- HAYWARD J.N., PAVASUTHIPAISIT K., PERES-LOPEZ F.R., SOFRONIEW M.V. -
Radioimmunoassay of arginine vasopressin in rhesus monkey plasma.
Endocrinology, 1976, 94, 975
- HERBERT V., LAU K.S., GOTTLIEB G.W., BLEICHER S.J. -
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocr. Metabl., 1965, 25, 1375
- HIRS C.W., MOORE S., STEIN W.H. -
A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease.
J. Biol. Chem., 1953, 200, 493
- HUNTER W.M., GREENWOOD F.C. -
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature (London), 1962, 194, 495
- JEFFERS W.A., LIVEZEY M.M., AUSTIN J.H. -
A method for demonstrating and antidiuretic action for minute amounts of pitressin. Statistical analysis of results.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1942, 50, 184
- JOHNSTON C.I., HUTCHINSON J.S., MORRIS B.J., DAX E.M. -
Release and clearance of neurophysins and posterior pituitary hormones.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1975, 248, 272
- KHOKHAR A.M., RAMAGE C.M., SLATER J.D.H. -
Radioimmunoassay of arginine vasopressin in urine.
J. Endocrin., 1975, 67, 66
- KLEIN L., ROTH J., PETERSEN M.J. -
Radioimmunoassay of arginine vasopressin (antidiuretic hormone).

LEGROS J.J., FRANCHIMONT P. -

The purification and modification of immunological and physicochemical behaviour of iodinated posterior pituitary hormones.

In "Radioimmunoassay Methods" K.E. KIRKHAM and W.H. HUNTER Eds.
Churchill Livingstone 1971, 40

LEGROS J.J., GOVAERTS A., DEMOULIN A., FRANCHIMONT P. -

Interactions entre un dérivé progestatif (acétate de Noréthistérone) et l'éthinyl œstradiol sur l'élimination urinaire de neurophysine, d'ocytocine et de vasopressine immunoréactives et sur le taux de neurophysines sériques I et II chez l'Homme normal.

C.R. Soc. Biol. (Paris), 1973, 167, 1688

LEGROS J.J. -

Données actuelles sur la neurophysine et ses rapports avec les troubles de la fonction antidiurétique.

In "Hormones et Régulations métaboliques" MASSON Ed., Paris 1973, 117

LEGROS J.J., REYNAERT R., PEETERS G. -

Specific release of bovine neurophysin I during milking and suckling in the Cow.

J. Endocr., 1974, 66, 327

LEGROS J.J., REYNAERT R., PEETERS G. -

Specific release of bovine neurophysin II during arterial or venous haemorrhage in the Cow.

J. Endocr., 1975, 67, 297

LEGROS J.J. -

Les Neurophysines.

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'Agrégé d'Enseignement Supérieur (Liège), 1976, MASSON Ed.

LEGROS J.J. -

Hormones post-hypophysaires et neurophysines. Dosage et signification physiologique.

In "Compte-Rendu du IIIème Colloque International de Radioimmunologie de Lyon", 1976, p. 221

LIN S.Y., ELLIS H. -

Preparations and properties of iodinated angiotensin

Biochem. Pharmacol., 1970, 19, 651

MARCHETTI J. -

Contribution à l'étude des interactions entre hormone antidiurétique et hormones corticosurrénales.

Thèse Doctorat d'Etat Es Sciences Nat., Paris 1975

MENARD J., MILLIEZ P. -

Système de dosage radioimmunologique de l'hormone antidiurétique.

C.R. Acad. Sci. (Paris), 1970, 270, 1053

MENARD J., FRESSINAUD P., BREMINER J., FOLIOT A., CORVOL P. -

Les méthodes de dosage de l'hormone antidiurétique. Leur application à l'étude de la sécrétion de vasopressine.

In Hormones et Régulations métaboliques hydrocorticoïdiques, glucocorticoïdiques et lipidiques. Rapport de la 12ème Réunion des Endocrinologistes de langue française C.H.U. Pitié Salpêtrière, 1973, MASSON Ed.

- MERKELBACH U., CZERNICHOW P., GAILLARD R.C., VALLOTTON M.B. -
Radioimmunoassay of arginine vasopressin. Application to determination of antidiuretic hormone in urine.
Acta Endocr., 1975, 80, 453
- MIDGLEY A.R., NISWANDER D.G., REBAR R.W. -
Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity).
In "*Immunoassay of Gonadotrophins*" E. DIEZFALUSY Ed., Karolinska Symposia, Stockholm 1969, 163
- MILLER M., MOSES A.M. -
Radioimmunoassay of vasopressin with a comparison of immunological and biological activity in the rat posterior pituitary.
Endocrinology, 1969, 84, 557
- MILLER M., MOSES A.M. -
In vivo and in vitro inactivation of biological activity of vasopressin by antiserum to lysine vasopressin.
Endocrinology, 1969, 84, 798
- MILLER M., MOSES A.M. -
Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone with application to the study of the Brattleboro rat.
Endocrinology, 1971, 88, 1389
- MILLER M., MOSES A.M. -
Radioimmunoassay of urinary antidiuretic hormone in man : response to water load and dehydration in normal subjects.
J. Clin. Endocr. Metab., 1972, 34, 537
- MORTON D.J., WAIGHT M.A. -
The possible relationship between the affinity of arginine-vasopressin antibodies and the degree of polyuria and polydipsia in actively immunized rabbits.
J. Endocr., 1972, 54, 523
- NISONOFF A. -
Conjugated and synthetic antigen.
In "*Method in Immunology and in Immunochemistry*", 1967, 1, 120
C.A. WILLIAMS and M.W. CHASE Eds., New York Academic Press.
- OYAMA S.M., KAGAN A., GLICK S.M. -
Radioimmunoassay of vasopressin : Application unextracted human urine.
J. Clin. Endocr. Metab., 1971, 33, 739
- PERMUTT M.A., PARKER C.W., UTIGER R.D. -
Immunochemical studies with lysine-vasopressin.
Endocrinology, 1966, 78, 809
- RICHARD-RELKIN M.D. -
The pineal.
In "*Animal research on the pineal*" D.F. HORRINDIN Ed., Edon Press, Montreal 1970.
- ROBINSON A.G., ZIMMERMAN E.A., FRANTZ A.G. -
Physiologic investigation of posterior pituitary binding proteins neurophysin I and neurophysin II.
Metabolism, 1971, 20, 1148

ROBINSON A.G. -

Isolation and secretion of individual human neurophysins.
J. Clin. Invest., 1975, 55, 360

ROBINSON A.G. -

The neurophysins in health and disease.
Clin. Endocr. Metab., 1977, 6, 261

ROTH J., KLEIN L.A., PETERSEN M.J. -

Vasopressin antibodies and a sensitive radioimmunoassay.
J. Clin. Invest., 1966, 45, 1064

RUBIN R.T., POLAND R.E., RAVESSOUD F., GOUIN P.R., TOWER B.B. -

Antidiuretic hormone : Episodic nocturnal secretion in adult man.
Endocrine Research Communications, 1975, 2, 459

SCHILD H.O. -

A method of conducting a biological assay on a preparation giving repeated gradual responses illustrated by the estimation of histamine.
J. Physiol. (London), 1942, 101, 115

STURMER E. -

Bioassay procedures for neurohypophyseal hormones and similar polypeptids.
In "*Neurophysical hormones and similar polypeptids*" B. BERDE Ed., Springer-Verlag, Berlin 1968, 136

THOMPSON E.E., FREYCHET P., ROTH J. -

Monoiodo-oxytocin : demonstration of its biological activity and specific binding to isolated fat cells.
Endocrinology, 1972, 91, 1199

VAN CAUWENBERGE H., LEGROS J.J., FRANCHIMONT P. -

Vasopressin and oxytocine. Part II - Radioimmunoassays.
In *Assays of Protein and polypeptid hormones*; H. VAN CAUWENBERGE et P. FRANCHIMONT Eds., Pergamon Press, New-York 1970, 136

VORHERR H., MUNSICK R.A. -

Identification of neurohypophysical hormones with their antisera.
J. Clin. Invest., 1970, 49, 828

WEITZMAN R.E., FISHER D.A., DISTEFANO J.J., BENNETT C.M. -

Episodic secretion of arginine vasopressin.
Am. J. Physiol., 1977, 233, E 32

WU W.H., ROCKEY J.H. -

Antivasopressin antibody. Characterization of high affinity rabbit antibody with limited association constant heterogeneity.
Biochem. N.Y., 1969, 8, 2719

ZIMMERMAN E.A., ROBINSON A.G. -

Hypothalamic neurons secreting vasopressin and neurophysins.
Kidney Intern., 1976, 10, 12

